

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos



## TESIS DOCTORAL

**Evaluación y diseño de bacterias lácticas (BAL) de origen alimentario  
y de otros hospedadores como factorías celulares de producción de  
bacteriocinas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Juan José Jiménez Martínez**

Directores

Pablo Hernández Cruza  
Luis M. Cintas Izarra  
Carmen Herranz Sorribes

**Madrid, 2015**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y  
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**EVALUACIÓN Y DISEÑO DE BACTERIAS  
LÁCTICAS (BAL) DE ORIGEN ALIMENTARIO  
Y DE OTROS HOSPEDADORES COMO  
FACTORÍAS CELULARES DE PRODUCCIÓN  
DE BACTERIOCINAS**

**TESIS DOCTORAL**

**JUAN JOSÉ JIMÉNEZ MARTÍNEZ**

**Madrid, 9 de Abril de 2015**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y  
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**EVALUACIÓN Y DISEÑO DE BACTERIAS  
LÁCTICAS (BAL) DE ORIGEN ALIMENTARIO  
Y DE OTROS HOSPEDADORES COMO  
FACTORÍAS CELULARES DE PRODUCCIÓN  
DE BACTERIOCINAS**

Memoria que, para optar al título de Doctor con mención honorífica de  
“Doctorado Europeo”, presenta el Licenciado  
Juan José Jiménez Martínez

**Madrid, 9 de Abril de 2015**





DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y  
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS  
FACULTAD DE VETERINARIA

Ciudad Universitaria , s/n.  
28040 Madrid  
Teléfono: 91 394 3749.  
Fax: 91 394 37 43

**PABLO E. HERNÁNDEZ CRUZA, LUIS M. CINTAS IZARRA Y CARMEN HERRANZ SORRIBES, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD, PROFESOR TITULAR DE UNIVERSIDAD Y PROFESORA CONTRATADA DOCTORA, RESPECTIVAMENTE, DEL DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,**

**CERTIFICAN:**

Que la Tesis Doctoral titulada: **“Evaluación y diseño de bacterias lácticas (BAL) de origen alimentario y de otros hospedadores como factorías celulares de producción de bacteriocinas”**, de la que es autor el Licenciado en Biología **D. Juan José Jiménez Martínez**, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección conjunta de los que suscriben y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor con mención honorífica de “Doctorado Europeo”.

Madrid, 10 de Abril de 2015.

Los Directores de la Tesis Doctoral,

Pablo E. Hernández Cruza

Luis M. Cintas Izarra

Carmen Herranz Sorribes



A mis padres, por todo.





Mi primer agradecimiento se dirige hacia todos aquéllos que habéis contribuido de una u otra manera a mi formación como doctor y, especialmente, como persona.

A los Profesores Lorenzo de la Hoz y María Dolores Selgas, Directores del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos durante la realización de este trabajo investigador por acogerme en el Departamento, por la ayuda recibida y por la amabilidad con la que me han tratado durante estos años.

De manera muy especial quisiera expresar mi gratitud a mis directores de tesis los Profesores Pablo E. Hernández Cruza, Luis M. Cintas Izarra y Carmen Herranz Sorribes por sus consejos, ayuda, ánimo, entusiasmo y dedicación que han hecho las largas horas en el laboratorio animadas y la realización de esta tesis doctoral tremendamente enriquecedora tanto a nivel científico como personal.

A todas las personas que han compartido espacio y tiempo conmigo en punto LAB. A Bea, con quien tuve mis primeras reflexiones científicas. A Jorge y Antonio, con quienes coincidí poco, pero con quienes compartí divertidas anécdotas. A Juan, por guiarme en el laboratorio y en el intrincado mundo científico incluso con mis re-re-re-preguntas y mis chistes poco ocurrentes. Me siento afortunado y orgulloso de haber coincidido contigo y de compartir nuestra amistad. A Loreto, por tu eficiencia, tus charlas, sonrisas, por estar a las duras y a las maduras, por tu sincera amistad y por...tantas cosas. Y por conocer el significado de palabras que sólo yo pensaba conocer!! A Cris, porque nunca me lo he pasado tan bien como con tus charlas con Juan, por tu grata sonrisa y por ser tan buena persona. A Estefanía, por tu sinceridad ... me has hecho replantearme muchas cosas. A Carlinhos, por tu alegría y paciencia por compartir siempre un café en el Hospital Clínico Veterinario. Y a Sara, por disfrutar de tu compañía tanto en España como en Noruega y por tu inestimable ayuda, muchas veces, en la distancia. Trabajar y convivir con vosotros ha sido una experiencia extraordinaria; ir al laboratorio y pasar horas y horas con vosotros siempre fue un placer. No quisiera olvidarme de otros estudiantes con los que he compartido laboratorio mientras realizaba mi tesis y, especialmente, de Boz por sus disquisiciones científicas y nuestras buenas tardes y noches madrileñas.

También quiero dar las gracias a los demás miembros del Departamento que, de una u otra manera, han hecho posible esta Tesis Doctoral. Gracias a Charo por su amabilidad, cariño y profesionalidad. A Juan Miguel por su buen humor y más de una charla en la puerta de entrada al Departamento. A Fernanda, Teresa, Isabel, Paloma, María y Ana por su ayuda cuando la he necesitado y por hacer del Departamento un lugar agradable dónde permanecer muchas horas.

A los compañeros del laboratorio del fondo: Violeta, María, Miguel Ángel, Nicolette, Silvia, Alicia, Inés, Almudena, Eugenia... porque hemos compartido muchas horas juntos y siempre lo hemos pasado bien. Y a los del laboratorio de al lado: Esther, Virginia, Maldo, Susana, Arantxa, Marta, Rebeca, Irene... porque siempre nos quedarán las charlas en El Lagar!! Y a mis amigos y amigas de la Facultad de Veterinaria, siempre dispuestos a compartir un café. Me llevo un gratísimo recuerdo de todos vosotros, sois geniales. Por supuesto, no podría dejar de acordarme de Aurora, Santiago, Alberto, Rosi... gracias de todo corazón por vuestra ayuda.

Gracias también al Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) por la concesión de una Beca Predoctoral (BES-2007-16543) de Formación del Personal Investigador (FPI), así como las Ayudas para Estancias Investigadoras Cortas en la Norwegian University of Life

Sciences, As (Norway). Asimismo, el trabajo investigador realizado ha sido posible gracias a los fondos recibidos de los proyectos S-505/AGR/0265, S2009/AGR-1489 y S2013/ABI-2747 de la Comunidad de Madrid (CAM), del Banco Santander Central Hispano - Universidad Complutense de Madrid (BSH-UCM, Proyectos GR58/08, GR35-10A y GR3/14), del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN, proyecto AGL2009-08348) y del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO, proyecto AGL2012-34829).

I also would like to thank to all the Norwegian friends I have made not only during my short stays in the Laboratory of Microbial Genetics (LMG), Department of Chemistry, Biotechnology and Food Science (IKBM), Norwegian University of Life Sciences (NMBU), As (Norway) but also nowadays building up my professional career in Norway. Special thanks to Ingolf, who accepted me for short research stays in his laboratory and for his guidance and fantastic European mood!! Also thanks to Dzung for his brilliant and helping ideas, to Helge for his wise comments and to Morten Skaugen for his help in the interpretation of proteomic results. Special thanks to Margrethe, Morten Kjos, Emma, Hans and Dag for their help to feel like at home during the first time I was in Norway and to the technicians Maia, Linda and Zhiam for their constant attention and help. I would not either forget to give my special thanks to the new students in the lab Norwegians and from many other origins (China, Turkey, Russia...) that complement so happily my everyday life nowadays. Tusen takk!

A mis amigos de siempre, José, Tito, Luis, Perello, Casáux, Villa, Quique, Carlos, Juan, Raúl, Nacho, Javi, Didi...y muchos más que no cabrían en este párrafo por haberme ayudado a ser quién soy y haberlo hecho siempre. También a los amigos que conocí en la Universidad SEK de Segovia los que son para siempre aun cuando nos veamos de Pascuas a Ramos como María, Fer, Silvia, Ru, Natalia, Itziar, Germán, Juanjo, Samuel... porque he aprendido muchísimo de vosotros. And to all my friends in Norway, specially Karo and Maryan who doubtlessly have become much more than good friends.

A mi FAMILIA. Especialmente a mis padres porque siempre me han dado ese empujón para seguir por el sendero que he elegido con amor y una sonrisa, por sus gratificantes y entusiastas consejos y porque siempre están cuando les necesito. Soy quién soy gracias a vosotros. Y a mis hermanos que siempre han entendido y confiado en lo que estoy haciendo, ayudándome cuando ha sido necesario.

A Gesine, quién ha compartido conmigo los últimos años de esta tesis comprendiendo mejor que nadie el tiempo y dedicación que esto conlleva. Gracias por recibirme siempre con un beso y una sonrisa incluso cuando teníamos que hablar por Skype o llegaba tarde a casa. Y gracias también por mostrarte siempre dispuesta a ayudarme con tu amor y tu cariño.

# ÍNDICE



	Pág.
<b>CAPÍTULO 1 / CHAPTER 1</b>	1
EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR: OBJETIVOS	3
GENERAL ACCOUNT OF THE RESEARCH SUBJECT: OBJECTIVES	5
<b>CAPÍTULO 2</b>	7
INTRODUCCIÓN GENERAL	9
<u>2.1. LAS BACTERIAS LÁCTICAS</u>	9
2.1.1. EL GÉNERO <i>Lactobacillus</i>	10
2.1.2. EL GÉNERO <i>Enterococcus</i>	10
2.1.3. LAS BAL COMO PROBIÓTICOS	12
<u>2.2. BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS LÁCTICAS (BAL)</u>	14
2.2.1. DEFINICIÓN	14
2.2.2. CLASIFICACIÓN	15
2.2.3. BACTERIOCINAS DE LA CLASE IIa	17
2.2.3.1. Características estructurales	18
2.2.3.2. Organización genética, biosíntesis y regulación	19
2.2.3.3. Mecanismo de acción y espectro antimicrobiano	20
2.2.3.4. Inmunidad	22
2.2.3.5. Enterocina A	23
2.2.3.6. Sakacina A	26
2.2.3.7. Bacteriocina E50-52	27
2.2.3.8. Diseño de genes sintéticos que codifican la síntesis microbiana de bacteriocinas	28
2.2.4. BACTERIOCINAS SINTETIZADAS SIN SECUENCIA LÍDER O PÉPTIDO SEÑAL	28
<u>2.3. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE BACTERIOCINAS</u>	31
2.3.1. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE BACTERIOCINAS POR BACTERIAS LÁCTICAS	31
2.3.1.1. Producción heteróloga de bacteriocinas basada en el intercambio de secuencias líder (SL) y/o de genes del sistema transportador-ABC o sistema de transporte dedicado (DTS)	31
2.3.1.2. Producción heteróloga de bacteriocinas basada en la fusión de la bacteriocina a un PS reconocido por la GSP o sistema SEC-dependiente	34
2.3.2. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE BACTERIOCINAS POR LEVADURAS	39
<b>CAPÍTULO 3 / CHAPTER 3</b>	43
CLONACIÓN, PRODUCCIÓN Y EXPRESIÓN FUNCIONAL DE LA BACTERIOCINA SAKACINA A (SAKA) Y DE DOS DE SUS QUIMERAS DERIVADAS DE LA SAKA POR BACTERIAS LÁCTICAS (BAL) Y LAS LEVADURAS <i>Pichia pastoris</i> Y <i>Kluyveromyces lactis</i>	

*CLONING, PRODUCTION AND FUNCTIONAL EXPRESSION OF THE BACTERIOCIN SAKACIN A (SAKA) AND TWO SAKA DERIVED CHIMERAS IN LACTIC ACID BACTERIA (LAB) AND THE YEASTS Pichia pastoris AND Kluyveromyces lactis*

ABSTRACT	45
3.1. INTRODUCTION	46
3.2. MATERIALS AND METHODS	47
3.2.1. Microbial strains, plasmids and growth conditions	47
3.2.2. Basic genetic techniques and enzymes	48
3.2.3. PCR amplification and nucleotide sequencing	48
3.2.4. Recombinant plasmids derived from pNZ8048	51
3.2.5. Recombinant plasmids derived from pMG36c	51
3.2.6. Antimicrobial activity of the recombinant bacterial strains	52
3.2.7. Cloning of the sakacin A structural gene ( <i>sapA</i> ) and its <i>EntP/SakA</i> (GCTACG:: <i>sapA</i> ) chimera in <i>P. pastoris</i> X-33 and <i>K. lactis</i> GG799, and determination of their antimicrobial activity	52
3.2.8. Production of specific anti-SakA polyclonal antibodies and ELISA	55
3.2.9. Purification of SakA, <i>EntP/SakA</i> and <i>EntA/SakA</i> , mass spectrometry analysis, and N-terminal amino acid sequencing	56
3.3. RESULTS	56
3.3.1. Heterologous production and functional expression of SakA and two SakA-derived chimeras, <i>EntP/SakA</i> and <i>EntA/SakA</i> , by different LAB strains	56
3.3.2. Purification of SakA, <i>EntP/SakA</i> , and <i>EntA/SakA</i> , mass spectrometry analysis, and N-terminal amino acid sequencing	59
3.3.3. Heterologous production and functional expression of SakA and <i>EntP/SakA</i> by <i>P. pastoris</i> and <i>K. lactis</i>	61
3.3.4. Purification and mass spectrometry analysis of the SakA and <i>EntP/SakA</i> produced by <i>P. pastoris</i> and <i>K. lactis</i>	61
3.4. DISCUSSION	62
3.5. ACKNOWLEDGEMENTS	70
3.6. REFERENCES	71
<b>CAPÍTULO 4 / CHAPTER 4</b>	77

**USO DE GENES SINTÉTICOS PARA LA CLONACIÓN, PRODUCCIÓN Y EXPRESIÓN FUNCIONA DE LAS BACTERIOCINAS ENTEROCINA A Y BACTERIOCINA E 50-52 POR *Pichia pastoris* Y *Kluyveromyces lactis***

*USE OF SYNTHETIC GENES FOR CLONING, PRODUCTION AND FUNCTIONAL EXPRESSION OF THE BACTERIOCINS ENTEROCIN A AND BACTERIOCIN E 50-52 BY Pichia pastoris AND Kluyveromyces lactis*

ABSTRACT	79
----------	----

4.1. INTRODUCTION	81
4.2. MATERIALS AND METHODS	82
4.2.1. Microbial strains, plasmids, and growth conditions	82
4.2.2. Basic genetic techniques and enzymes	84
4.2.3. PCR amplification and nucleotide sequencing	84
4.2.4. Cloning of the <i>entA</i> and <i>bacE50-52</i> synthetic genes in <i>P. pastoris</i> X-33 and <i>K. lactis</i> GG799, and antimicrobial activity of the transformants	84
4.2.5. ELISA for quantification of the production of EntA	87
4.2.6. Purification of the bacteriocins EntA and BacE50-52, and mass spectrometry analysis	87
4.3. RESULTS	87
4.3.1. Heterologous production and functional expression of EntA and BacE50-52 by recombinant <i>P. pastoris</i> X-33 and <i>K. lactis</i> GG799	87
4.3.2. Purification of the bacteriocins EntA and BacE50-52, and mass spectrometry analysis	88
4.3.3. Antimicrobial activity of the purified EntA and BacE50-52 against <i>Listeria</i> spp. and other selected bacteria	89
4.4. DISCUSSION	90
4.5. ACKNOWLEDGEMENTS	97
4.6. REFERENCES	97
<b>CAPÍTULO 5 / CHAPTER 5</b>	103
<b>SUSTITUCIÓN DE LA SECUENCIA LÍDER Y EVALUACIÓN DE DIFERENTES VECTORES PARA LA PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LA BACTERIOCINA ENTEROCINA A POR <i>Lactobacillus sakei</i> Lb790, <i>Lactobacillus plantarum</i> NC8 Y <i>Lactobacillus casei</i> CECT475</b>	
<b>REPLACEMENT OF THE LEADER SEQUENCE AND EVALUATION OF DIFFERENT VECTORS FOR HETEROLOGOUS EXPRESSION OF THE BACTERIOCIN ENTEROCIN A BY <i>Lactobacillus sakei</i> Lb790, <i>Lactobacillus plantarum</i> NC8 AND <i>Lactobacillus casei</i> CECT475</b>	
ABSTRACT	105
5.1. INTRODUCTION	107
5.2. MATERIALS AND METHODS	108
5.2.1. Microbial strains, plasmids, and growth conditions	108
5.2.2. Basic genetic techniques and enzymes	110
5.2.3. PCR amplification and nucleotide sequencing	110
5.2.4. Recombinant plasmids derived from pSIP409, pSIP411 and pMG36c	110
5.2.5. Antimicrobial activity of the recombinant <i>Lactobacillus</i> spp. strains	110
5.2.6. ELISA for detection and quantification of EntA	111
5.2.7. Purification of EntA and mass spectrometry analyses	111



5.3. RESULTS	113
5.3.1. Heterologous production and functional expression of EntA by different <i>Lactobacillus</i> spp. strains	113
5.3.2. Purification of EntA and mass spectrometry analysis	116
5.4. DISCUSSION	116
5.5. ACKNOWLEDGEMENTS	120
5.6. REFERENCES	120
<b>CAPÍTULO 6 / CHAPTER 6</b>	<b>125</b>
 <i>Enterococcus faecalis</i> DBH18, UN ENTEROCOCO CON POTENCIALES APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS CODIFICA LOS GENES PRODUCTORES DE BACTERIOCINAS <i>ef1097</i> Y <i>entL50A-entL50B</i> Y GENES SIMILARES A LA <i>entL50A-entL50B</i> DENOMINADOS <i>entJSA</i> Y <i>entJSB</i>	
 <i>Enterococcus faecalis</i> DBH18, AN ENTEROCOCCAL STRAIN WITH POTENTIAL BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS ENCODES THE BACTERIOCIN-PRODUCING GENES <i>ef1097</i> AND <i>entL50A-entL50B</i> , AND THE <i>entL50A-entL50B</i> -LIKE GENES TERMED <i>entJSA</i> AND <i>entJSB</i>	
ABSTRACT	127
6.1. INTRODUCTION	129
6.2. MATERIALS AND METHODS	130
6.2.1. Bacterial strains, media, and growth conditions	130
6.2.2. Bacteriocinogenic activity assays	130
6.2.3. Basic genetic techniques	131
6.2.4. PCR-amplification of genomic DNA of <i>E. faecalis</i> DBH18 and <i>E. faecium</i> L50	131
6.2.5. Sequencing of <i>entJSA-entJSB</i> and adjacent genes	134
6.2.6. Cloning of <i>entJSA</i> and <i>entJSB</i> in <i>Escherichia coli</i> and in vitro transcription/translation assay	134
6.2.7. ELISA assays	134
6.2.8. Purification of the bacteriocins produced by <i>E. faecalis</i> DBH18, mass spectrometry (MS) analysis, and de novo MS-MS peptide mapping	135
6.2.9. Nucleotide sequence accession number	135
6.3. RESULTS	135
6.3.1. PCR-amplification and nucleotide sequencing of bacteriocin-encoding genes of <i>E. faecalis</i> DBH18	135
6.3.2. Sequencing of the <i>entL50A-entL50B</i> -like genes and their adjacent genes in <i>E. faecalis</i> DBH18	136
6.3.3. In vitro transcription/translation of the <i>entJSA-entJSB</i> genes of <i>E. faecalis</i> DBH18	137
6.3.4. Purification of the bacteriocins produced by <i>E. faecalis</i> DBH18, mass spectrometry analysis, and de novo MS-MS peptide mapping	143

6.3.5. Bacteriocin production and antimicrobial activity in supernatants from <i>E. faecalis</i> DBH18 and <i>E. faecium</i> L50	145
6.4. DISCUSSION	145
6.5. ACKNOWLEDGEMENTS	153
6.6. REFERENCES	154
<b>CAPÍTULO 7 / CHAPTER 7</b>	161
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b>	163
7.1. <u>CLONACIÓN, PRODUCCIÓN Y EXPRESIÓN FUNCIONAL DE LA BACTERIOCINA SAKACINA A (SakA) Y DE DOS QUIMERAS DE LA SakA, POR BACTERIAS LÁCTICAS (BAL) Y LAS LEVADURAS <i>Pichia pastoris</i> Y <i>Kluyveromyces lactis</i></u>	163
RESUMEN	163
7.1.1. Construcción de vectores de expresión derivados de los plásmidos pNZ8048 y pMG36c	164
7.1.2. Construcción de vectores de expresión derivados de los plásmidos pPICZαA y pKLAC2	164
7.1.3. Producción heteróloga y expresión funcional de la SakA y de dos de sus quimeras génicas por bacterias lácticas (BAL) y las levaduras <i>Pichia pastoris</i> y <i>Kluyveromyces lactis</i>	164
7.1.4. Purificación de la SakA y de dos de sus quimeras y determinación de su tamaño molecular por espectrometría de masas	167
7.1.5. Actividad antimicrobiana frente a <i>Listeria</i> spp. de los sobrenadantes de las BAL productoras de bacteriocinas	169
7.2. <u>USO DE GENES SINTÉTICOS PARA LA CLONACIÓN, PRODUCCIÓN Y EXPRESIÓN FUNCIONAL DE LAS BACTERIOCINAS ENTEROCINA A Y BACTERIOCINA E 50-52 POR <i>Pichia pastoris</i> Y <i>Kluyveromyces lactis</i></u>	169
RESUMEN	169
7.2.1. Construcción de vectores de expresión derivados de los plásmidos pPICZαA y pKLAC2	170
7.2.2. Producción heteróloga y expresión funcional de la EntA y BacE50-52 por las levaduras <i>Pichia pastoris</i> y <i>Kluyveromyces lactis</i>	170
7.2.3. Purificación a homogeneidad de la EntA y BacE50-52 y determinación de su tamaño molecular por espectrometría de masas	171
7.2.4. Actividad antimicrobiana frente a <i>Listeria</i> spp. de las bacteriocinas purificadas EntA y BacE50-52	172
7.3. <u>SUSTITUCIÓN DE LA SECUENCIA LIDER Y EVALUACIÓN DE DIVERSOS VECTORES PARA LA PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LA BACTERIOCINA ENTEROCINA A POR <i>Lactobacillus sakei</i> Lb790, <i>Lactobacillus plantarum</i> NC8 Y <i>Lactobacillus casei</i> CECT475</u>	174

RESUMEN	174
7.3.1. Construcción de vectores de expresión derivados de los plásmidos pSIP409, pSIP411 y pMG36c	175
7.3.2. Producción heteróloga y expresión funcional de la EntA por <i>Lactobacillus</i> sp.	176
7.3.3. Purificación de la EntA y análisis de su tamaño molecular por espectrometría de masas	178
7.3.4. Actividad antimicrobiana frente a <i>Listeria</i> spp. de los sobrenadantes de las cepas productoras de bacteriocinas	179
<u>7.4. <i>Enterococcus faecalis</i> DBH18, UN ENTEROCOCO CON POTENCIALES APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS CODIFICA LOS GENES PRODUCTORES DE BACTERIOCINAS <i>efl097</i> Y <i>entL50A-entL50B</i> Y GENES SIMILARES A LOS <i>entL50A-entL50B</i> DENOMINADOS <i>entJSA</i> Y <i>entJSB</i></u>	180
RESUMEN	180
7.4.1. Amplificación por PCR y secuenciación de los genes de <i>E. faecium</i> L50 y <i>E. faecalis</i> DBH18 productores de bacteriocinas	181
7.4.2. Secuenciación de genes similares a <i>entL50A-entL50B</i> y de sus genes adyacentes en <i>E. faecalis</i> DBH18	183
7.4.3. Experiencias de transcripción/traducción in vitro de los genes <i>entJSA-entJSB</i> de <i>E. faecalis</i> DBH18	184
7.4.4. Purificación de las bacteriocinas producidas por <i>E. faecalis</i> DBH18, análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) y mapeo peptídico	185
7.4.5. Producción de bacteriocinas y actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de <i>E. faecalis</i> DBH18 y <i>E. faecium</i> L50	185
<b>CAPÍTULO 8 / CHAPTER 8</b>	189
CONCLUSIONES	191
CONCLUSIONS	193
TRABAJO FUTURO	195
TRABAJO FUTURO	197
<b>RESUMEN / SUMMARY</b>	201
RESUMEN	201
Introducción	203
Objetivos	203
Resultados	204
Conclusiones	207
Bibliografía	209

<i>SUMMARY</i>	211
<i>Introduction</i>	211
<i>Objectives</i>	211
<i>Results</i>	212
<i>Conclusions</i>	215
<i>References</i>	217
<b>BIBLIOGRAFÍA/REFERENCES</b>	219
<b>APÉNDICES</b>	235
APÉNDICE 1: LISTADO DE ABREVIATURAS	237
APÉNDICE 2: LISTADO DE TABLAS	241
APÉNDICE 3: LISTADO DE FIGURAS	243
APÉNDICE 4: CÓDIGO GENÉTICO	247



# **CAPÍTULO / CHAPTER 1**

**Exposición general del problema a investigar: Objetivos**

---

**General account of the research subject: Objectives**



Uno de los objetivos de la legislación alimentaria actual es lograr un nivel elevado de protección de la salud de los consumidores y, por ello, los productos alimenticios no deberían contener microorganismos ni sus toxinas u otros metabolitos en cantidades que supongan un riesgo inaceptable para la salud humana. Para reducir los riesgos y mejorar la salud pública no solamente conviene considerar cuestiones políticas, económicas y sociales sino, también, utilizar criterios científicos como el establecimiento de criterios microbiológicos, definidos en el Reglamento de la Unión Europea (Reglamento CE 2073/2005). Otras estrategias de protección microbiana de los alimentos recaen en el establecimiento de Objetivos de Inocuidad de los Alimentos (OIA, del inglés *Food Safety Objective o FSO*) y de Niveles Apropriados de Protección (NAP, del inglés *Appropriate Level of Protection o ALOP*), basados en la aplicación durante el procesado de los alimentos de Criterios de Rendimiento (CR, del inglés *Performance Criterium o PC*) y de Objetivos de Rendimiento (OR, del inglés *Performance Objective o PO*).

Pero, sin duda el progreso en el desarrollo y evaluación de estrategias de antagonismo biológico que permitan eliminar, reducir o controlar la presencia en los alimentos de microorganismos responsables de toxiinfecciones alimentarias y, sobre todo, de *Listeria monocytogenes*, debería recaer en el desarrollo y evaluación de procedimientos más sencillos, seguros y eficaces de síntesis, producción y, en algunos casos, de recuperación y purificación de péptidos antimicrobianos producidos por bacterias (bacteriocinas) con elevada actividad antimicrobiana y espectro de acción. Por ello, durante el desarrollo de este trabajo se ha considerado conveniente el desarrollo de estrategias de clonación, producción y expresión funcional de las bacteriocinas conocidas más activas o de mayor espectro de acción en hospedadores: (a) que sean más seguros, (b) que las produzcan en mayores cantidades, (c) que faciliten su purificación, (d) que faciliten su empleo como ingredientes alimentarios con actividad antimicrobiana y (e), que les confieran la posibilidad de utilizarlos como cultivos iniciadores, protectores o probióticos de los alimentos. Dichas estrategias permitirán, además, desarrollar procedimientos experimentales para la evaluación y diseño de bacterias lácticas (BAL) de origen alimentario como "factorías celulares" de producción de otras proteínas y péptidos de interés para la industria alimentaria por su potencial antimicrobiano, inmunógeno, antihipertensivo, edulcorante, antioxidante u otro.

Por consiguiente, los objetivos de este trabajo de investigación han sido los siguientes:

(1). La producción y expresión funcional de la sakacina A madura (SakA, codificada por *sapA*) y de su proteína conocida de inmunidad (SakI, codificada por *sapiA*) de *Lb. sakei* Lb706 por otras bacterias lácticas (BAL), fusionadas a diversos péptidos señal (PS) y clonadas en vectores de expresión proteica con promotores inducibles o constitutivos.

(2). La clonación, producción y expresión funcional de la sakacina A madura (SakA), producida por *Lb. sakei* Lb706, así como de dos de sus quimeras génicas con la secuencia aminoacídica N-terminal de la enterocina P (EntP/SakA) y de la enterocina A (EntA/SakA), por las levaduras *P. pastoris* X-33 y *K. lactis* GG799 utilizando vectores de expresión proteica con promotores inducibles.



(3). El diseño y utilización de genes sintéticos para la producción de las bacteriocinas enterocina A (EntA), activa frente a bacterias Gram-positivas y de la bacteriocina E50-52 (BacE50-52) descrita como una bacteriocina activa frente a bacterias patógenas Gram-positivas y Gram-negativas de interés en la industria alimentaria, mediante la clonación de los genes sintéticos deducidos de la secuencia aminoacídica conocida de las bacteriocinas citadas en vectores de expresión proteica con promotores inducibles y evaluación de su producción y expresión funcional por las levaduras *P. pastoris* X-33A y *K. lactis* GG799.

(4). La clonación, producción y expresión funcional de la enterocina A (EntA), producida por *E. faecium* T136 y de elevada actividad antilisteriana, por bacterias lácticas (BAL) del género *Lactobacillus* utilizando los vectores de expresión proteica pSIP409 y pSIP411 con promotores inducibles y el plásmido pMG36c con promotor constitutivo.

(6). La determinación en *E. faecalis* DBH18, una cepa de elevado interés biotecnológico, de los genes estructurales que codifican las bacteriocinas enterococina V583 (EntV583) y enterocina L50 (EntL50A y EntL50B), y evaluación de los genes estructurales y adyacentes similares a los *entL50-entL50B*, denominados *entJSA* y *entJSB* y que codifican la enterocina JS (EntJSA y EntJSB).

One of the objectives of current food legislation is to achieve a high level of protection of the consumers and, therefore, food products should not contain neither microorganisms nor their toxins or other metabolites in concentrations that could present an unacceptable risk for human health. In order to reduce risks and to improve the Public Health it is not only convenient to consider political, economical and social issues, but also the use of scientific criteria like the establishment of microbiological criteria, as defined in the European Union Regulations (Commission Regulation (EC) N° 2073/2005) on microbiological criteria for foodstuffs. Other microbial food protection strategies rely on the establishment of Food Safety Objectives (FSO) and Appropriate Levels of Protection (ALOP), based on the establishment of Performance Criterium (PC) and performance Objectives (PO) during food processing operations.

But, with no doubt the progress in the development and evaluation of biological strategies to eliminate, reduce or control in food the presence of food-borne pathogenic microorganisms and, specially, *Listeria monocytogenes*, should rely on the development and evaluation of easier, safer and more efficient procedures for the synthesis, production and, in some cases, recovery and purification of antimicrobial peptides produced by bacteria (bacteriocins) with high antimicrobial activity and wide spectra. Therefore, during this work has been considered convenient the development of strategies for cloning, production and functional expression of the most active bacteriocins or with the broadest spectra in heterologous hosts that: (a) are safer; (b) that produce the bacteriocins in higher amounts; (c) that facilitate their purification; (d) that facilitate their use as food ingredients with antimicrobial activity and (e), that confer the possibility to use of the producer hosts as starter cultures, protective cultures or probiotics in food. These strategies will also surely permit the development of experimental procedures for the evaluation and design of lactic acid bacteria (LAB) of food origin as “cell factories” for production of other proteins and peptides of interest to the food industry due to their antimicrobial, immunogenic, antihypertensive, edulcorant, antioxidant or other effects.

Accordingly, the objectives of this research work have been the following:

(1). The cloning, production and functional expression of mature sakacin A (SakA, encoded by *sapA*) and its cognate immunity protein (SakI, encoded by *sapiA*) and produced by *Lb. sakei* Lb706 by other lactic acid bacteria (LAB), fused to different signal peptides (SP) and cloned into different protein expression vectors bearing inducible or constitutive promoters.

(2). The cloning, production and functional expression of mature sakacin A (SakA), produced by *Lb. sakei*. Lb706, and two of its genetic chimeras carrying the enterocin P (EntP/SakA) and enterocin A (EntA/SakA) N-terminal amino acid sequence, by the yeasts *P. pastoris* X-33 y *K. lactis* GG799 using expression vectors with inducible promoters.

(3). The design and use of synthetic genes for production of the bacteriocins enterocin A (EntA), active against Gram-positive bacteria and the bacteriocin E50-52 (BacE50-52),

described as an active bacteriocin against pathogenic Gram-positive and Gram-negative bacteria of interest in food industry, through the cloning of synthetic genes deduced from the amino acid sequence of the cited bacteriocins in expression vectors with inducible promoters, and evaluation of their production and functional expression by the yeasts *P. pastoris* X-33A and *K. lactis* GG799.

(4). The cloning, production and functional expression of the enterocin A (EntA), produced by *E. faecium* T136 and with high antilisterial activity by lactic acid bacteria (LAB) from the genera *Lactobacillus* using the expression vectors pSIP409 and pSIP411 with inducible promoters and the plasmid pMG36c with a constitutive promoter.

(5). The determination in *E. faecalis* DBH18, a strain with potential biotechnological applications of the structural genes encoding the bacteriocins enterococcin V583 (EntV583) and enterocin L50 (EntL50A and EntL50B), and evaluation of the structural and adjacent genes similar to *entL50-entL50B*, denominated *entJSA* y *entJSB* and encoding the enterocin JS (EntJSA and EntJSB).

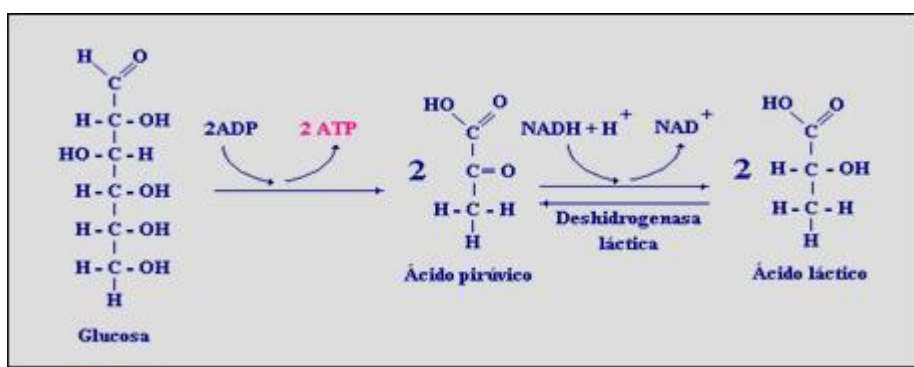
# CAPÍTULO 2

## Introducción general



## 2.1. LAS BACTERIAS LÁCTICAS

Las bacterias lácticas (BAL), bacterias ácido lácticas o bacterias productoras de ácido láctico constituyen un grupo de microorganismos Gram-positivos que muestran una morfología y fisiología muy heterogénea. Su principal característica es la producción de ácido láctico como producto mayoritario de su metabolismo fermentativo de los carbohidratos (**Fig. 2.1**). Las BAL son bacterias de morfología bacilar o cocoide y, en general, son microorganismos esporulados, microaerófilos o anaerobios facultativos, con un contenido de guanina y citosina (G+C) inferior a 50 mol%, que toleran bien valores bajos de pH y carecen de citocromos y catalasa *sensu stricto*.



**Figura 2.1.** Esquema simplificado de la fermentación láctica.

Las BAL pertenecen al filo *Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales* que incluye las familias *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* y *Streptococcaceae*. Aunque a principios del siglo XX la primera clasificación de las BAL realizada por Orla Jensen (1919) sólo incluyó los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Strteptococcus* la mejora de herramientas taxonómicas, especialmente el desarrollo de los métodos de biología molecular, ha permitido incrementar el número de géneros conocidos de las BAL incluyendo los géneros *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulun*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella* (Axelsson, 1998a; Cintas y col., 2000a, 2001; Sánchez, 2008). Las BAL se localizan en hábitats ricos en nutrientes caracterizados por la presencia de carbohidratos solubles y productos de la degradación de proteínas y vitaminas y con baja tensión de oxígeno como la leche y productos lácteos, productos cárnicos y vegetales fermentados, frutas y hortalizas frescas, ensilados, pescados y otros derivados de la pesca (Lindgren y Dobrogosz, 1990; Aguirre y Collins, 1993; Stiles, 1996; Cintas y col., 2000a). Además, muchas BAL son frecuentes en el tracto gastrointestinal y en las mucosas del hombre y los animales, así como en el estiércol y en las aguas residuales urbanas e industriales (Aguirre y Collins, 1993; Axelsson, 1998a; Cintas y col., 2000a).

### 2.1.1. EL GÉNERO *Lactobacillus*

Las bacterias de este género son ácido-tolerantes, anaerobias estrictas o microaerófilas y, según su metabolismo fermentativo, se clasifican como especies homofermentativas estrictas (el producto final mayoritario de su metabolismo es el ácido láctico) y heterofermentativas facultativas o estrictas (los productos finales de su metabolismo son el ácido láctico, ácido acético, dióxido de carbono y etanol) (Vandamme y col., 1996; Stiles y col., 1997). El género *Lactobacillus* engloba un gran número de especies bacterianas entre las que se encuentran *Lb. sakei*, *Lb. casei*, *Lb. reuteri*, *Lb. acidophilus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum* y otras, la mayoría microorganismos biotecnológicamente útiles tanto en la industria alimentaria, como en la farmacéutica y veterinaria.

Las bacterias del género *Lactobacillus* ocupan numerosos y diversos nichos ecológicos en la naturaleza. En el ser humano se localizan en el tracto gastrointestinal (tracto GI), desde la cavidad oral hasta las heces. En la boca, especies como *Lb. casei* y *Lb. gasseri*, entre otras, se desarrollan tanto en la saliva como en la placa dental, protegiendo al hospedador frente a microorganismos patógenos pero contribuyendo, a su vez, a la erosión dental por ser bacterias acidificantes (Haukioja y col., 2008; Yang y col., 2010b). Por otra parte, las especies que se encuentran en el tracto GI y las heces son más numerosas y variadas que las localizadas en otros nichos ecológicos y dependen de cada individuo. Aun así, su representación en el total de las BAL presentes en las heces es pequeña (0,2-1,0 %) (Mueller y col., 2006; Dicks y col., 2011) pero genéticamente son microorganismos muy bien adaptados al ecosistema del sistema digestivo. Por último, también pueden encontrarse bacterias de este género formando parte de la microbiota vaginal y de la leche materna (Collado y col., 2009; Raven y col., 2011).

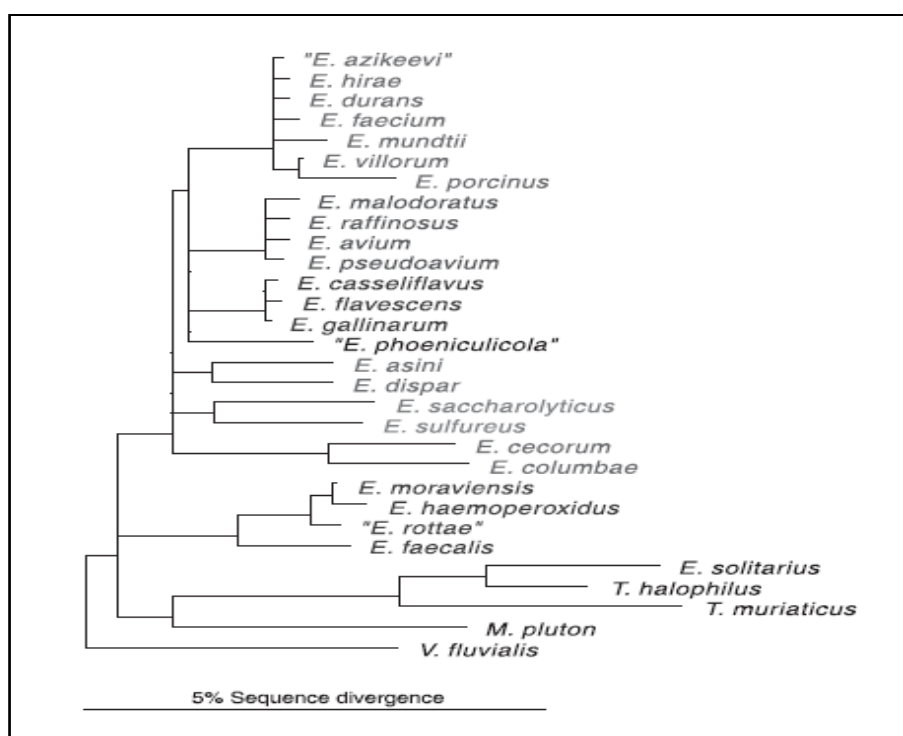
Las BAL del género *Lactobacillus* han formado parte de nuestra dieta desde tiempos inmemoriales (Bengmark, 1998) y, actualmente, las encontramos en gran variedad de alimentos como cultivos iniciadores de productos fermentados como yogures, quesos y leches fermentadas, además de su presencia natural en la carne y pescado fresco (Chailou y col., 2005) y de influir significativamente en las cualidades organolépticas de bebidas alcohólicas como la cerveza (Basanta y col., 2009).

### 2.1.2. EL GÉNERO *Enterococcus*

Aunque hasta la década de los 80 se consideraron dentro del género *Streptococcus*, posteriormente, los estreptococos fecales o del grupo D de Lancefield se dividieron en tres géneros filogenéticamente distintos reconocidos como *Streptococcus sensu stricto*, *Lactococcus* y *Enterococcus* (Schleifer y Kilpper-Bälz, 1984; Devriese y col., 1990; Devriese y col., 1995). Los estreptococos patógenos se incluyeron dentro del género *Streptococcus sensu stricto*, separándolos de otras especies como *Lactococcus lactis* subespecie (subesp.) *lactis* y *L. lactis* subesp. *cremoris* de interés en la industria alimentaria, que fueron agrupadas en el género *Lactococcus*. Asimismo, los estreptococos identificados en los alimentos fermentados, en el tracto GI de humanos y animales, y en otros nichos ecológicos constituyeron el género

*Enterococcus* (Franz y col., 2003, Sánchez, 2008). Filogenéticamente, los enterococos pertenecen al grupo clostridial de las eubacterias Gram-positivas junto con BAL de los géneros *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*. De éstos, los géneros *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus* son los filogenéticamente más cercanos a los enterococos (Franz y col., 1999a; Gutierrez, 2005). La identificación y caracterización de nuevas cepas y la disponibilidad de técnicas de hibridación del ácido desoxiribonucleico (ADN) y del ácido ribonucleico (ARN) han permitido la clasificación del género *Enterococcus* en 33 especies diferentes, que se encuentran subdivididas en 7 grupos denominados *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. gallinarum*, *E. cecorum*, un grupo que incluye *Enterococcus* no agrupados y, un último grupo, que comprende especies con taxonomía modificada (Köhler, 2007) (**Fig. 2.2.**).

Los enterococos son bacterias Gram-positivas de morfología cocoide, catalasa y oxidasa negativas, inmóviles, anaerobias facultativas y no formadoras de esporas ni cápsulas. Se diferencian de otros géneros como los mencionados *Streptococcus* y *Lactococcus* por desarrollarse entre 10 y 45 °C, en caldo de cultivo con un 6,5% (p/v) de cloruro sódico, en un rango de pH entre 4,6 y 9,6-10, en presencia de un 40% de sales biliares, en medios con un 0,04% (p/v) de azida de sodio y, por sobrevivir a temperaturas de 60°C durante 30 minutos (Franz y col., 2003; Martínez, 2003).



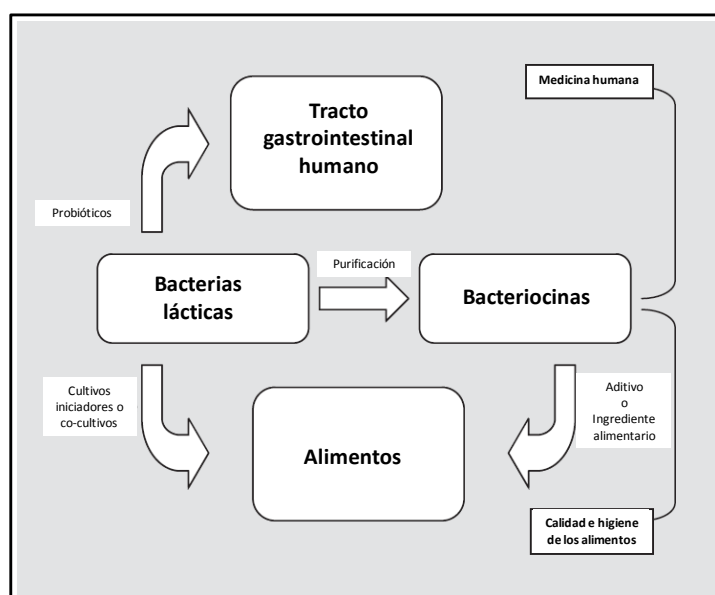
**Figura 2.2.** Árbol filogenético basado en estudios comparativos de la fracción 16S del ARNr de diversas especies de enterococos. La longitud de la barra indica un 5% de divergencia estimada en la secuencia. Fuente: Franz y col., (2003).



Debido a su capacidad para desarrollarse y sobrevivir en condiciones ambientalmente adversas, los enterococos se localizan habitualmente en el suelo, en los alimentos, en el agua, en las plantas y en los insectos, además de constituir una parte importante de la flora GI del hombre y los animales (Murray, 1990; Kayser, 2003; Nes y col., 2014). Entre las especies de *Enterococcus* reconocidas hasta la fecha, *E. faecium* y *E. faecalis* son los que con mayor frecuencia se aíslan del tracto GI de muchos mamíferos y de una gran variedad de alimentos, principalmente, de los de origen animal como la leche y productos lácteos y los embutidos crudos curados (Herranz, 2000). Se cree que por contaminaciones ambientales o desde el tracto GI los enterococos colonizan los alimentos y, posteriormente, se desarrollan en ellos durante su fermentación (Giraffa, 2003). *E. faecalis*, *E. faecium* y, en menor medida, *E. durans* se localizan en la leche y productos lácteos, mientras *E. hirae* y *E. casseliflavus* lo hacen ocasionalmente en estos sustratos (Franz y col., 1999a). La presencia de los enterococos en los alimentos es, en muchas ocasiones, beneficiosa desde un punto de vista tecnológico y de seguridad alimentaria. Se ha comprobado que los enterococos mejoran características sensoriales como el aroma y el sabor de los alimentos fermentados (Sarantinopoulos y col., 2001) contribuyendo, en ocasiones, a la obtención de productos únicos desde el punto de vista organoléptico (Franz y col., 2003). Por otro lado, los enterococos también se han empleado como cultivos iniciadores en productos tradicionales y artesanales, sobre todo, en quesos, embutidos y aceitunas de países mediterráneos en los que la fermentación se realiza por la flora endógena del alimento (Hugas y col., 2003; BenOmar y col., 2004) y, como probióticos tanto para personas como animales (Bellomo y col., 1980; Owings y col., 1990; Fukata y col., 1991; Franz y col., 1999a y 2003; Martínez, 2003). Además, algunos enterococos de origen alimentario producen péptidos antimicrobianos (bacteriocinas) antagonistas del desarrollo de microorganismos alterantes y patógenos de los alimentos eliminando o reduciendo su presencia de los alimentos y, mejorando, de este modo, su seguridad (Henderson y col., 1992; Nes y col., 2007; Franz y col., 2007).

### 2.1.3. LAS BAL COMO PROBIÓTICOS

Los probióticos se definen como microorganismos vivos que, en concentraciones adecuadas, confieren un efecto beneficioso al organismo hospedador (*Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting for the Evaluation of Probiotics in Food*, 2002). En este sentido, los microorganismos considerados mayoritariamente probióticos son los pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Asimismo, los probióticos deben sobrevivir a través del aparato digestivo, siendo capaces de resistir los jugos gástricos y biliares, pero también capaces de proliferar en el intestino. Además, deben mostrar un efecto beneficioso para la salud como en la prevención de enfermedades infecciosas y alergias alimentarias, reducción de los niveles de colesterol, actividad anticarcinogénica, estabilización de la mucosa gastrointestinal, propiedades inmunoadyuvantes y mejora en la digestión de lactosa en hospedadores intolerantes (Pineiro y Stanton, 2007; Kumari y col., 2011; van Tassel y Miller, 2011; Bertazzoni y col., 2013; Miller, 2014).



**Figura 2.3.** Posibles aplicaciones de las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas. Fuente: De Vuyst y Leroy, (2007).

El uso de los lactobacilos como probióticos está ampliamente extendido tanto en la industria alimentaria como en producción animal y a sus características beneficiosas para la salud hay que añadirle su gran aceptación social, debido a su presencia en numerosos derivados lácteos como yogures y quesos (Hu y col., 2009; Gaggia y col., 2010). Por el contrario, el uso de los enterococos como cultivos iniciadores o como probióticos ha sido objeto de debate por su posible potencial patógeno. Los enterococos se han considerado tradicionalmente como microorganismos indicadores de contaminación fecal, alterantes de los alimentos, productores de aminas biógenas y como patógenos oportunistas responsables de infecciones nosocomiales, especialmente en pacientes inmunodeprimidos o con enfermedades subyacentes (Franz y col., 2003; Foulquie-Moreno y col., 2006; Ogier y Serror, 2008). Los enterococos son la tercera causa más común de infecciones nosocomiales en los Estados Unidos (Wisplinghoff y col., 2004) y la cuarta en Europa (<http://www.earss.rivm.nl/>). Cepas de *E. faecalis* y, en menor proporción, de *E. faecium* se han aislado de bacteremias, infecciones del tracto genitourinario, endocarditis y de otras afecciones tanto de personas como animales (MacEachern y col., 2005; Ogier y Serror, 2008). Otras especies de enterococos como *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. mundtii* se han asociado a endoftalmitis y endocarditis en personas (Dargere y col., 2002; Poyart y col., 2002; Stepanovic y col., 2004; Higashide y col., 2005). Todo ello, unido a la existencia en algunas especies de enterococos de genes que codifican factores potenciales de virulencia (Eaton y Gasson, 2001; Martín y col., 2006; Sánchez y col., 2007b) y de resistencia a antibióticos (Haas y col., 2002; Shankar y col., 2002; Klare y col., 2003; Ogier y Serror, 2008; Perin y col., 2014), cuestiona su presencia en los alimentos. Por ello, en aquellos enterococos que pudieran utilizarse como cultivos iniciadores o probióticos, sería conveniente una evaluación previa y meticulosa de la existencia de factores potenciales de virulencia y de su resistencia a antibióticos, sobre todo, de los de mayor relevancia clínica (Franz y col., 2003; Kayser, 2003).

Tradicionalmente, una de las características que los microorganismos debían presentar para ser considerados probióticos era su capacidad para producir metabolitos con actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos como la producción de ácidos grasos de cadena corta, peróxido de hidrógeno o bacteriocinas (Gillor y col., 2008). En este sentido, existe ahora un debate en la comunidad científica sobre la consideración o no de las bacteriocinas como un factor probiótico *per se*. Los argumentos esgrimidos a favor son su capacidad de actuar como péptidos colonizadores, de manera que faciliten la introducción de un microorganismo productor en un nicho ecológico ocupado por otras especies bacterianas, de actuar como péptidos antimicrobianos inhibiendo directamente el desarrollo de microorganismos patógenos y, por último, de actuar como señales peptídicas de información biológica para otras bacterias a través de mecanismos de quórum o autoinducción (del inglés, *quorum sensing*) o incluso para la comunicación del productor con comunidades microbianas enteras o con el sistema inmune del hospedador (Dobson y col., 2011; Nes y col., 2014).

### **2.2. BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS LÁCTICAS (BAL)**

Las bacteriocinas producidas por BAL constituyen un grupo heterogéneo de péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal que varían en sus propiedades físico-químicas, espectro antimicrobiano, modo de acción, mecanismos responsables de su inmunidad, biosíntesis, procesamiento, transporte y regulación de su producción, así como en la organización molecular de los determinantes genéticos implicados en los procesos previamente descritos (Cintas y col., 2000b, 2001). Más aún, debido a la posible utilización de las bacteriocinas como bioconservadores de los alimentos pero también como antimicrobianos en medicina humana y veterinaria y en producción animal, durante los últimos años se ha producido un extraordinario avance en su investigación lo que ha permitido determinar mejor su estructura, características físico-químicas, modo de acción y la localización en el genoma bacteriano de los determinantes genéticos responsables de su síntesis, procesamiento, secreción, inmunidad y regulación (Sablon y col., 2000; Cintas y col., 2001; Nes y col., 2002; Skaugen y col., 2003; Cotter y col., 2005b; Deegan y col., 2006; Birri y col., 2010; Borrero y col., 2011c; Wan y col., 2012).

#### **2.2.1. DEFINICIÓN**

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal, con o sin modificaciones posttraduccionales, producidas y secretadas al medio extracelular por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Las bacteriocinas se incluyen dentro de un grupo amplio y heterogéneo de péptidos antimicrobianos producidos por, prácticamente, todos los organismos conocidos constituyendo por sí mismos uno de los principales sistemas celulares defensivos antimicrobianos (Lehrer y Ganz, 1999; Sang y Blecha, 2008; Guaní-Guerra y col., 2010; Wang y Lai, 2010). Hasta hoy se han descrito más de 1.500 péptidos antimicrobianos de distintos orígenes identificados en distintas bases de datos (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). Básicamente, se trata de péptidos de pequeño tamaño molecular, de naturaleza catiónica y anfipática, que actúan desestabilizando la membrana

citoplásmica de las células sensibles mediante el reconocimiento de receptores específicos de membrana y una combinación de efectos pleiotrópicos y que ejercen su actividad antimicrobiana, incluso, a concentraciones nanomolares (Cotter y col., 2005; Sit y Vederas, 2008). Generalmente, las bacterias Gram-positivas producen bacteriocinas de un tamaño molecular menor de 6 kilodaltons (kDa) y con un amplio espectro de acción, aunque con variaciones en su tamaño y actividad (Nissen-Meyer y col., 2009). Sin embargo, las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas como las colicinas de *Escherichia coli* son péptidos de un tamaño molecular superior a 20 kDa, a excepción de la colicina V (ColV) y las microcinas producidas por otras enterobacterias, de menor tamaño y espectro de acción que las bacteriocinas producidas por las bacterias Gram-positivas (Cascales y col., 2007).

### 2.2.2. CLASIFICACIÓN

Actualmente se posee información de más de 200 bacteriocinas caracterizadas (BAGEL: [http://bioinforma-tics.biol.rug.nl/websoftware/bagel/bagel\\_start.php](http://bioinforma-tics.biol.rug.nl/websoftware/bagel/bagel_start.php) y BACTIBASE: <http://bactibase.pfba-lab-tun.org/main.php>), pero debido a la continua aparición de bacteriocinas nuevas, a la ampliación de los conocimientos que se tiene de ellas y a la heterogeneidad de las bacteriocinas en cuanto a su tamaño molecular, modo de acción, propiedades bioquímicas y físico-químicas, espectro de acción y organización genética, se han propuesto diversas clasificaciones que permiten su agrupación en clases. Las clasificaciones más recientes proponen la división de las bacteriocinas en dos grandes grupos (Cotter y col., 2005; Nes y col., 2007) (**Tabla 2.1.**):

Clase I: bacteriocinas con aminoácidos modificados o lantibióticos. Son péptidos de pequeño tamaño molecular (<5 kDa) y termoestables, cuya característica principal es la presencia de aminoácidos modificados posttraduccionalmente como los aminoácidos 2, 3-deshidroalanina (Dha) y 2, 3-deshidrobutilina (Dhb), originados por deshidratación de la serina (Ser) y la treonina (Thr), respectivamente. Los compuestos lantionina (Lan) y  $\beta$ -metil-lantionina (MeLan) proceden de reacciones de condensación de la Dha o Dhb, respectivamente, con el grupo sulfhidrilo de las cisteínas (Cys) (McAuliffe y col., 2001; Bauer y Dicks, 2005). También se ha observado que, en algunos casos, la Dha puede convertirse en D-alanina (D-Ala) (Skaugen y col., 1994; Ryan y col., 2001), así como la presencia de modificaciones adicionales de los aminoácidos de algunos lantibióticos originando los derivados lisinoalanina (LAL), 2-oxobutirato, S-aminovinil-D-cisteína y S-aminovinil-D-metilcisteína (Jack y col., 1998). A su vez, en función de su estructura y modo de acción los lantibióticos se subdividen en: (a) lantibióticos elongados y catiónicos que actúan a nivel de membrana y cuyo prototipo es la nisina (Nis) y (b) lantibióticos globulares, aniónicos o neutros, inmunológicamente activos y que actúan como inhibidores enzimáticos (Jung, 1991). En cualquier caso, su estructura molecular hace que sea un grupo cuya clasificación resulta compleja; de hecho, se ha propuesto su subdivisión en 11 subgrupos, basándose en la secuencia aminoacídica de los péptidos no modificados (Cotter y col., 2005b).

**Clase II:** bacteriocinas que no contienen aminoácidos modificados. Son péptidos de pequeño tamaño molecular (<10 kDa), termoresistentes, hidrófobos, catiónicos y que, generalmente, actúan modificando la permeabilidad de la membrana citoplasmática con la efluencia de componentes bacterianos desde el citosol al exterior celular. Aunque se han propuesto diversas clasificaciones para las bacteriocinas de la clase II, la más aceptada es la que las subdivide en: clase IIa, bacteriocinas similares a las pediocinas con marcada actividad antilisteriana y que poseen una región aminoacídica N-terminal conservada del tipo YGNGVxC (aunque se conocen otras variaciones); clase IIb, bacteriocinas cuya actividad depende de la acción complementaria de dos péptidos; clase IIc, bacteriocinas circulares y, por último, la clase IId, que comprende aquéllas bacteriocinas lineales, de un sólo péptido y no incluidas en las subclases anteriores (Fimland y col., 2005; Drider y col., 2006; Franz y col. 2007; Nes y col., 2007; Kjos y col., 2011).

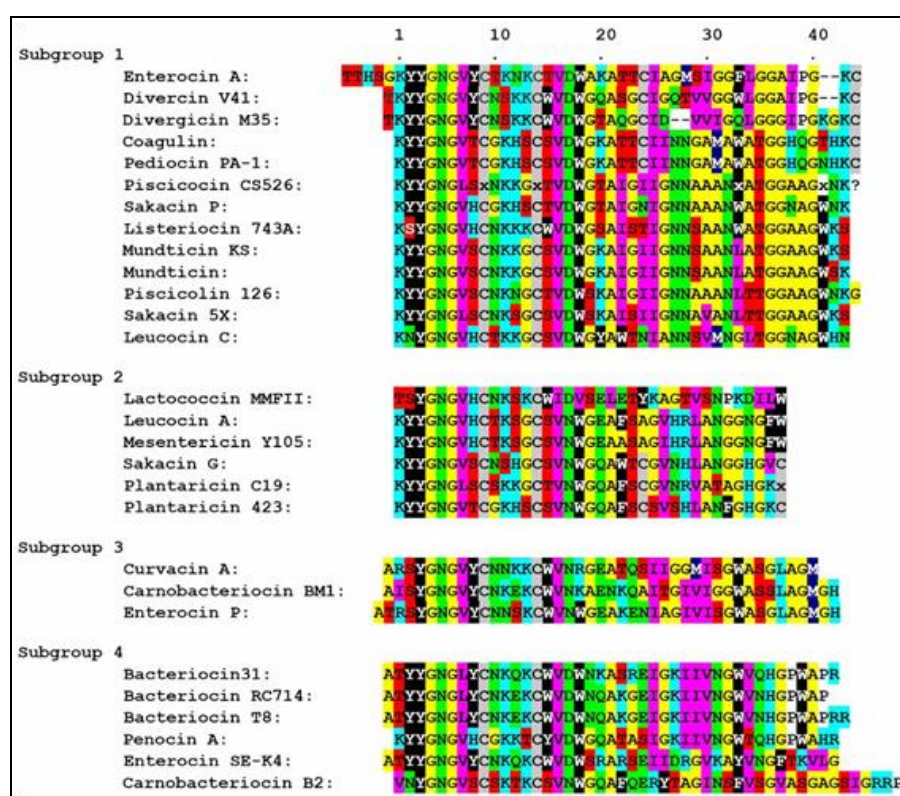
**Tabla 2.1.** Esquema de la clasificación más aceptada propuesta para las bacteriocinas

Classification	Remarks/suggestions	Examples
<b>Class I</b>		
Lanthionine-containing bacteriocins/lantibiotics	Includes both single- and two-peptide lantibiotics; up to 11 subclasses have been proposed	Single-peptide: nisin, mersacidin, lactacin 481; two-peptide: lactacin 3147, cytolysin
<b>Class II</b>		
Non-lanthionine-containing bacteriocins	Heterogeneous class of small peptides; includes pediocin-like (subclass a bacteriocins), two-peptide (subclass b bacteriocins), cyclic (subclass c; formerly class V), non-pediocin single linear peptides (subclass d)	Class IIa: pediocin PA1, leucocin A; class IIb: lactacin F; class IIc: enterocin AS48, reuterin 6; class IId: lactococcin A, divergicin A
<b>Bacteriolysins</b>		
Non-bacteriocin lytic proteins	Large, heat-labile proteins, often murein hydrolases	Lysostaphin, enterolysin A

Aunque ambos grupos engloban a la mayoría de las bacteriocinas conocidas, el hecho de que existan otras bacteriocinas que no se ajustan totalmente a esta clasificación hace que algunos investigadores mantengan que debería existir una clase III de bacteriocinas que comprendiese a todas aquellas bacteriocinas termolábiles de elevado tamaño molecular (>30 kDa), con, a su vez, una división en subclase IIIa, bacteriocinas líticas o bacteriolisinas y, subclase IIIb, o bacteriocinas no líticas (Heng y Tagg, 2006). Igualmente, otros investigadores insisten en la conveniencia de incorporar una clase IV de bacteriocinas que incluya a las bacteriocinas circulares. Las bacteriocinas circulares constituyen una familia única de péptidos antimicrobianos donde los aminoácidos nitroso-terminal (N-terminal) y carboxilo-terminal (C-terminal) se encuentran unidos por un enlace covalente, originando una estructura circular. Dicho enlace mejora la estabilidad termodinámica y la integridad estructural de la bacteriocina circular y mejora su actividad antimicrobiana. Asimismo, el término circular se ha adoptado para distinguir estas bacteriocinas de síntesis ribosomal de los péptidos antimicrobianos cíclicos, producidos por microorganismos mediante múltiples pasos de síntesis enzimática (Maqueda y col., 2008).

### 2.2.3. BACTERIOCINAS DE LA CLASE IIa

La pediocina PA-1 (PedA-1) fue la primera bacteriocina caracterizada de este grupo (Biswas y col., 1991; Nieto-Lozano y col., 1992) y, por ello, las bacteriocinas encuadradas en este grupo se denominan “similares a la pedicina” (del inglés, “*pediocin-like*”). Las bacteriocinas de la clase IIa son producidas por numerosas BAL y constituyen, posiblemente, el grupo mejor estudiado y más interesante biotecnológicamente de las bacteriocinas de la clase II (Fimland y col., 2005; Drider y col., 2006; Nissen-Meyer y col., 2009; Wan y col., 2012) (**Fig. 2.4.**). Su interés deriva de: (a), su posible uso como aditivos antimicrobianos naturales de los alimentos (b), de constituir una alternativa a los tratamientos antibióticos en animales (c), de su posible uso en producción animal para reducir o eliminar zoonosis y, finalmente, (d), de su posible utilidad en el diseño y construcción de BAL bacteriocinogénicas utilizables como cultivos iniciadores, protectores o probióticos en la industria alimentaria o como factorías celulares de producción de péptidos antimicrobianos, para su uso en medicina humana y veterinaria (Wachsman y col., 2003; Deegan y col., 2006; Drider y col., 2006; Gálvez y col., 2007; Khan y col., 2010).



**Figura 2.4.** Homología entre las bacteriocinas de la clase IIa. La mitad N-terminal es menos variable que la C-terminal y la clasificación de las bacteriocinas en 4 subgrupos se basa en semejanzas y diferencias en su región C-terminal. Se reconoce una estructura a modo de bisagra flexible en la posición D<sub>17</sub> conservada (en verde) de las bacteriocinas del subgrupo 1 y, presumiblemente, también en la posición D<sub>17</sub>/N<sub>17</sub> (en verde) de bacteriocinas de los subgrupos 2, 3 y 4. Esta bisagra flexible separaría la lámina-β del dominio N-terminal del dominio C-terminal. El color asignado a los aminoácidos es el siguiente: D, N, Q y E en verde; I, L y V en morado; Y, W y F en negro; C en gris; A y G en amarillo; H, K y R en azul; S y T en rojo; P en blanco; M en azul oscuro. Cabe destacar que para numerar los aminoácidos (en la zona superior de la figura) se toma como número 1 al segundo aminoácido, situado justo antes de la secuencia consenso YGNGV ya que éste es el primero de la bacteriocina madura de la mayoría de ellas. Fuente: Nissen-Meyer y col. (2009).

### 2.2.3.1. Características estructurales

Las bacteriocinas de la clase IIa son, generalmente, péptidos antimicrobianos de pequeño tamaño molecular (<10 KDa), de entre 37 y 48 aminoácidos, termoestables, con una carga neta positiva y un punto isoeléctrico (pI) de entre 8 y 10. Poseen una región aminoacídica N-terminal cargada e hidrofílica, caracterizada por una secuencia consenso YGNGVxCxxxxCxVxWxxA (donde x es cualquier amino ácido y CC son dos residuos de cisteína (C) unidos por un enlace disulfuro), aunque algunas bacteriocinas como la acidocina A (AcdA) no poseen residuos de cisteína y, otras, como la divercina V41 (DvnV41), plantaricina 423 (Pln423) y enterocina A (EntA) poseen dos residuos de cisteína adicionales en su región aminoacídica C-terminal (Nes y Holo, 2000). De su secuencia aminoacídica primaria se diferencian dos zonas: (i) la región N-terminal catiónica, hidrofílica y altamente conservada y, (ii) la región C-terminal, hidrofóbica y/o anfifílica y de secuencia aminoacídica más variable (Fimland y col., 1996, 2005).

Según Fimland y col. (2005), las bacteriocinas de la clase IIa podrían agruparse, a su vez, en 3 ó 4 subgrupos atendiendo a la similitud de su secuencia aminoacídica y a diferencias en su región C-terminal, menos conservada. Las bacteriocinas de los subgrupos 1, 3 y 4 son, por lo general, más largas que las del grupo 2 debido, principalmente, a la mayor longitud de su región C-terminal (**Fig. 2.4.**).

Investigaciones enfocadas a dilucidar la estructura de las bacteriocinas de la clase IIa como la leucocina A (LeuA) (Fregeau y col., 1997), carnobacteriocina B2 (CbnB2) (Wang y col., 1999), curvacina A (CurA) (Haugen y col., 2005), sakacina P (SakP) (Uteng y col., 2003) y de un mutante de la SakP (Uteng y col., 2003), realizadas por espectroscopia de dicroísmo circular (CD, del inglés *Circular Dichroism*) y por resonancia magnética nuclear (NMR, del inglés *Nuclear Magnetic Resonance*), revelaron que las bacteriocinas no adoptan una estructura definida en soluciones acuosas, sino que son capaces de adquirir estructuras secundarias diferenciadas en ambientes hidrofóbicos, simulando las condiciones de la zona externa de la membrana de las bacterias (Nissen-Meyer y col., 2009). En esta clase de bacteriocinas, la región N-terminal de la bacteriocina madura presenta una estructura en lámina- $\beta$  estabilizada por un enlace disulfuro, mientras la región C-terminal presenta, aunque con algunas excepciones, una estructura a modo de horquilla que consiste en una hélice- $\alpha$  anfifílica (desde el residuo 18 hasta el 33, aproximadamente) seguida de una cola C-terminal que se dobla hacia el centro de la hélice- $\alpha$  (Fregeau y col., 1997; Uteng y col., 2003). También es posible apreciar una bisagra (del inglés, *hinge*) flexible en el residuo conservado D-17 del subgrupo 1, entre la lámina  $\beta$  de la región aminoacídica N-terminal y la estructura a modo de horquilla de la región aminoacídica C-terminal con dos dominios con movilidad del uno hacia el otro (Uteng y col., 2003).

En algunas bacteriocinas de la clase IIa como la EntA, divergicina M35 (DivM35), divercina 41 (Div41), PedA-1, sakacina G (SakG) y Pln423 la estructura a modo de horquilla se estabiliza por medio de un enlace disulfuro entre la C de la mitad de la hélice- $\alpha$  y la C de su región C-terminal. Sin embargo, la mayoría de las bacteriocinas de la clase IIa carecen de



dos residuos de cisteína en los lugares descritos y, en su lugar poseen un triptófano (W) central conservado en la posición 18 de la mayoría de las bacteriocinas y otro residuo de triptófano, cerca de la región aminoacídica C-terminal, que juegan un papel predominante en la estabilización de la estructura de las bacteriocinas (Fimland y col., 2002; Nissen-Meyer y col., 2009). Las bacteriocinas del subgrupo 3 y la enterocina SE-K4 (EntSE-K4) y CbnB2 del subgrupo 4, carecen tanto del enlace disulfuro como del residuo de triptófano en su extremo aminoacídico C-terminal, siendo difícil asegurar que presenten también una conformación en forma de horquilla. La resolución de la estructura tridimensional de la CurA (del subgrupo 3) reveló que en su mitad C-terminal adquiere una conformación del tipo hélice-bisagra-hélice, que la diferencia de la conformación a modo de horquilla (Haugen y col., 2005). Aun así, ambas estructuras deben ser funcionalmente equivalentes ya que son las encargadas de penetrar en la membrana de las células diana (Nissen-Meyer y col., 2009).

### 2.2.3.2. Organización genética, biosíntesis y regulación

Los genes encargados del procesamiento, transporte y secreción de las bacteriocinas de la clase IIa se encuentran localizados la mayoría de las veces en plásmidos, excepto algunos, como los que codifican la EntA (Aymerich y col., 1996), DvnV41 (Métivier y col., 1998), SakP (Hühne y col., 1996) y las CbnB2 y Carnobacteriocina BM1 (CbnBM1) (Quadri y col., 1997), localizados en el cromosoma de la bacteria productora (Dridier y col., 2006). Asimismo, los genes que codifican bacteriocinas de la clase IIa suelen ordenarse en un único operon o en varios. En el caso de las bacteriocinas cuyo procesamiento, transporte y secreción se realiza por un sistema de transporte dedicado (DTS) los genes estructural y de inmunidad, los genes de procesamiento, transporte y secreción y los genes de regulación de la síntesis de la bacteriocina se encuentran, generalmente, coalineados. Sin embargo, las bacteriocinas cuyo procesamiento, transporte y secreción se realiza por la ruta general de secreción (GSP) o sistema Sec-dependiente poseen una organización génica más sencilla constituida, generalmente, por el gen estructural y el de inmunidad coalineados (Ennahar y col., 2000a; Cintas y col., 2001; Skaugen y col., 2003). También puede ocurrir que los genes implicados en la síntesis de bacteriocinas de la clase IIa no se localicen en un mismo lugar ni determinante genético, como ocurre con la PedA-1 producida por *Pediococcus parvulus* y *Lactobacillus plantarum* WHE92 en los que tanto el gen estructural como el de inmunidad se localizan en un plásmido mientras que los genes encargados de su procesamiento, transporte y secreción se encuentran en otro plásmido diferente (Miller y col., 2005).

También se conoce que la síntesis y producción de las bacteriocinas de la clase IIa precisa un mínimo de cuatro genes: (i) el gen estructural que codifica la prebacteriocina; (ii) el gen de inmunidad que codifica una proteína de inmunidad que protege al productor de la actividad antimicrobiana de su propia bacteriocina; (iii) el gen que codifica el transportador-ABC; y (iv) el gen que codifica una proteína accesoria de función no bien conocida. La síntesis de bacteriocinas de la clase IIa puede estar regulada por un sistema de transducción de señal de tres componentes (del inglés, *quorum sensing*) basado, principalmente, en la densidad celular del cultivo productor. Pero, además de por este sistema de regulación la síntesis de muchas bacteriocinas de la clase IIa puede verse regulada por otros factores como



la temperatura, la fuerza iónica y el pH del medio de cultivo (Cintas y col., 1997; Leroy y De Vuyst, 1999; Fimland y col., 2000). En algunos casos, la producción de bacteriocinas ocurre a 20°C mientras que su producción disminuye hasta ser nula a temperaturas de entre 35°-37°C o superiores (Cintas y col., 1997; Leroy y De Vuyst, 1999; Diep y col., 2000; Fimland y col., 2000). En el caso de la SakA, producida por *Lb. sakei* 706, cuya síntesis está regulada por un sistema de transducción de señal de tres componentes, se ha observado que no es posible inducir la producción de bacteriocina en presencia del péptido inductor cuando el microorganismo se desarrolla a 37°C (Nes y Eijsink, 1999; Diep y col., 2000).

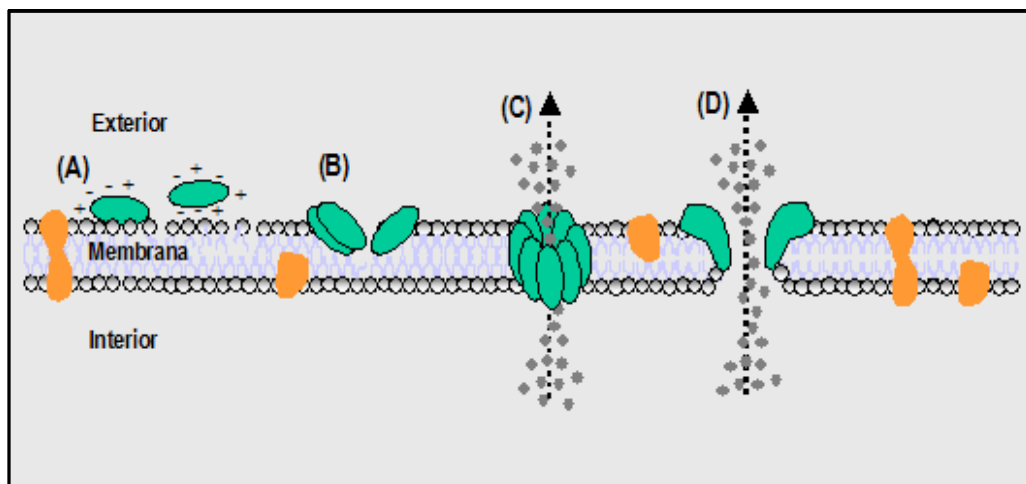
### 2.2.3.3. Mecanismo de acción y espectro antimicrobiano

Resultados derivados de mutaciones *in vitro* de aminoácidos de la estructura primaria de las bacteriocinas sugieren que la unión de las bacteriocinas de la clase IIa a la superficie de las células diana ocurre por medio de interacciones electrostáticas a través de su región aminoacídica N-terminal (Chen y col., 1997; Kazazic y col., 2002) (**Fig. 2.5.**). Cuando la carga neta de la región N-terminal de las bacteriocinas modificadas se altera, sustituyendo un residuo cargado positivamente por uno con carga neutra, muestran una menor afinidad por las células diana y una reducción de su actividad antimicrobiana (Miller y col., 1998; Kazazic y col., 2002; Morisset y col., 2004). Esta unión facilitaría la penetración de la región C-terminal de la bacteriocina en la membrana de las células diana. Este mecanismo de acción puede tener lugar gracias a la flexibilidad estructural de la región bisagra que une las regiones aminoacídicas N-terminal y C-terminal de las bacteriocinas de la clase IIa (Nissen-Meyer y col., 2009).

No obstante, parece que los dominios N-terminal y C-terminal de las bacteriocinas de la clase IIa funcionan de manera independiente. Algunos estudios han demostrado que bacteriocinas híbridas, creadas por la fusión de la región N-terminal y C-terminal de distintas bacteriocinas de la clase IIa, son igualmente activas que las bacteriocinas de las que proceden. Las bacteriocinas híbridas son activas frente a las mismas bacterias que las que aportan su región C-terminal, lo que sugiere que su dominio C-terminal es el determinante de especificidad de las bacteriocinas de la clase IIa (Johnsen y col., 2005a). Estas observaciones concuerdan con otros estudios en los que modificaciones aminoacídicas por mutagénesis *in vitro* de la región C-terminal de algunas bacteriocinas, alteran su especificidad por las células diana (Fimland y col., 2000; Fimland y col., 2002).

También se ha determinado que proteínas del sistema de transporte de carbohidratos, como las del sistema manosa-fosfotransferasa (man-PTS) parecen estar implicadas en la interacción de las bacteriocinas de la clase IIa con la membrana celular, siendo su presencia necesaria para que las bacterias sean sensibles a dichas bacteriocinas (Ramnath y col., 2000; Gravesen y col., 2000; Héchar y col., 2001; Dalet y col., 2001; Xue y col., 2005). Estudios proteómicos realizados en geles bidimensionales han determinado que bacterias naturalmente sensibles a la acción de la LeuA se convierten en resistentes cuando carecen de la subunidad MptA del sistema man-PTS (Gravesen y col., 2002). Otros estudios han demostrado como la producción heteróloga de la subunidad MptC del sistema man-PTS en bacterias naturalmente

resistentes de *Lactococcus lactis* las convierten en sensibles a la acción de la bacteriocina evaluada (Ramnath y col., 2004). Otro estudio ha demostrado como las bacteriocinas de la clase IIa se unen a las subunidades MptC y/o MptD del sistema man-PTS, embebidas en la membrana celular y como esta interacción origina alteraciones en la conformación del sistema man-PTS, modificando la permeabilidad de la membrana celular (Diep y col., 2007). Asimismo, otros estudios han demostrado que las subunidades IIC y IID de las proteínas del sistema man-PTS poseen secuencias aminoacídicas que las diferencian de otras subunidades no reconocidas por bacteriocinas de esta clase, sugiriendo que estas regiones aminoacídicas pueden ser responsables la especificidad de su reconocimiento por las bacteriocinas de la clase IIa (Kjos y col., 2009, 2010).



**Figura 2.5.** Modo de acción tradicional propuesto para bacteriocinas producidas por bacterias lácticas. Su modo de acción deriva de su: unión a la membrana mediante interacciones electrostáticas (A), inserción en la misma (B) y la formación de poros que pueden ser de dos tipos: en forma de dula de barril (C) o de cuña (D). Fuente: Martínez (2000).

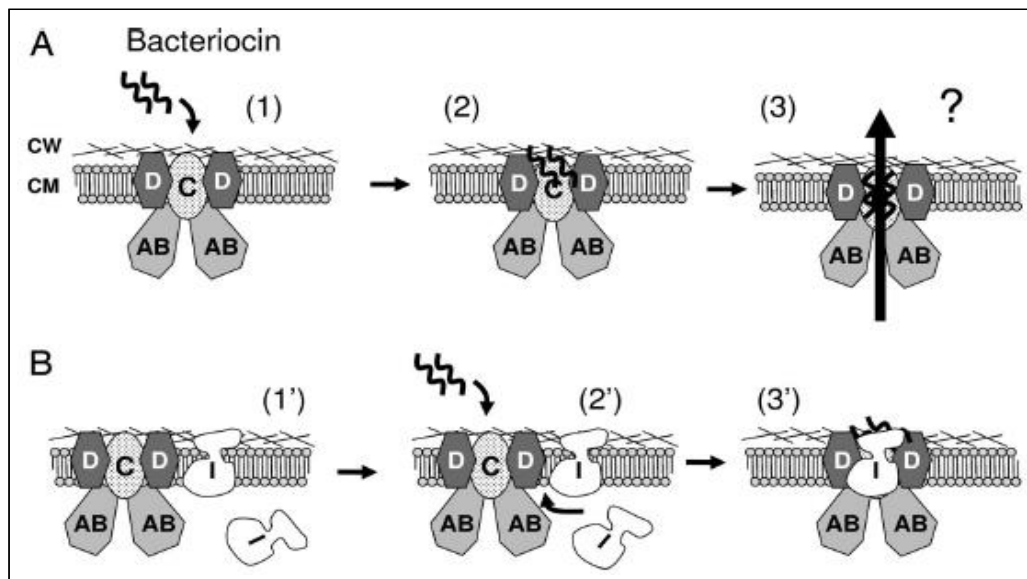
Se conoce que las bacteriocinas de la subclase IIa son muy activas frente a *Listeria* spp., pero también se ha observado que su actividad antimicrobiana se extiende a otras bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Salmonella* y *Campylobacter* (Eijsink y col., 1998; Ennahar y col., 2000a; Lauková y col., 2003; Svetoch y col., 2008a, b; Barbosa y col., 2013). También se ha determinado que la presencia de un enlace disulfuro en la región C-terminal de algunas bacteriocinas puede incrementar su actividad antimicrobiana y espectro de acción. Cuando Eijsink y col., (1998) evaluaron la actividad antimicrobiana de cuatro bacteriocinas de la subclase IIa como la CurA, SakP, PedA-1 y EntA con uno o dos enlaces disulfuro, los resultados obtenidos confirmaron que las bacteriocinas con dos enlaces disulfuro (PedA-1 y EntA) poseían una actividad antimicrobiana más elevada y un mayor espectro de acción en comparación con las que poseían un sólo enlace disulfuro en su extremo N-terminal (CurA y SakP), lo que sugiere que la elevada actividad antimicrobiana de la PedA-1 y de la EntA se debe, al menos en parte, al enlace disulfuro de su región C-terminal (Borrero y col., 2011a; 2012).

#### 2.2.3.4. Inmunidad

Se conoce que las bacterias productoras de bacteriocinas de la clase IIa producen proteínas de inmunidad que protegen a la productora de la actividad antimicrobiana de sus propias bacteriocinas (Venema y col., 1994; 1995; Axelsson y Holck, 1995; Quadri y col., 1995; Hühne y col., 1996; Johnsen y col., 2005a). La función de las proteínas de inmunidad se demostró cuando se consiguió que bacterias naturalmente sensibles a la acción de bacteriocinas fueran resistentes cuando producían, de manera heteróloga, proteínas de inmunidad (Quadri y col., 1995; Mathur y col., 2014).

De la evaluación de la secuencia aminoacídica de, al menos, 20 proteínas de inmunidad para bacteriocinas de la clase IIa (Fimland y col., 2005), se ha determinado que todas muestran una homología en su secuencia aminoacídica de entre el 5-85%, poseen entre 88-115 aminoácidos y muestran un cierto grado de especificidad a la bacteriocina asociada a ellas y, en algunos casos, a otras bacteriocinas de la misma subclase (Fimland y col., 2002; Johnsen y col., 2004; 2005a). De los estudios acerca de la estructura tridimensional de las proteínas de inmunidad de las bacteriocinas CbnB2, EntA y PedA-1 se deduce que a pesar de que estas proteínas confieren inmunidad frente a tres bacteriocinas de la clase IIa muy diferentes entre sí, todas ellas comparten básicamente la misma estructura tridimensional (Dalhus y col., 2003; Sprules y col., 2004; Johnsen y col., 2005b; Kim y col., 2007).

Las proteínas de inmunidad de las bacteriocinas de la clase IIa tienen una localización intracelular y a pesar de que son relativamente hidrofóbicas, se distribuyen en la cara interna de la membrana celular desde donde ejercen su modo de acción (Quadri y col., 1995; Dayem y col., 1996). Estudios realizados con bacteriocinas de la clase IIa y proteínas de inmunidad híbridas sugieren que la región C-terminal de la bacteriocina podría interaccionar con la mitad C-terminal de la proteína de inmunidad, quizás a través de la estructura flexible de la cola C-terminal de la proteína de inmunidad (Johnsen y col., 2005a). De todas maneras, todavía no se ha podido demostrar una interacción física directa entre las proteínas de inmunidad y las bacteriocinas (Sprules y col., 2004). No obstante, a la vista de que el dominio C-terminal de las bacteriocinas no parece penetrar completamente en la membrana celular, se ha sugerido que la interacción entre la proteína de inmunidad y la bacteriocina podría ser indirecta y tener lugar mediante la unión de la proteína de inmunidad a la zona interna del receptor de la bacteriocina, bloqueando la interacción del receptor con la bacteriocina (Sprules y col., 2004; Fimland y col., 2005; Johnsen y col., 2005a). Finalmente, estudios recientes han demostrado que las proteínas de inmunidad de las bacteriocinas de la clase IIa interaccionan con proteínas del sistema manosa-fosfotransferasa (man-PTS), perturbando la unión de la bacteriocina a su receptor (Diep y col. 2007; Kjos y col., 2010) (**Fig. 2.6.**).



**Figura 2.6.** Inmunidad debida a la lactococina A, lactococina B y, posiblemente, a otras bacteriocinas de la clase IIa. **(A)** La bacteriocina reconoce las subunidades IIC y IID del sistema manosa-fosfotransferasa (man-PTS) como receptores en las células diana (1 y 2). Tras unirse a ellas, la bacteriocina activa la permeabilización de la membrana (3) permitiendo la liberación de componentes celulares y desencadenando la muerte celular. **(B)** En las células inmunes o resistentes (1'), la proteína de inmunidad (I) no se encuentra unida a proteínas del sistema man-PTS. Sólo cuando la bacteriocina se añade al medio de cultivo (2'), la proteína de inmunidad (I) se aproxima y se une a la proteína receptora (subunidades IIC y IID). De esta manera, las bacterias inmunes o resistentes a la actividad de las bacteriocinas quedan protegidas, probablemente por el bloqueo de la unión de la bacteriocina al receptor, evitando de este modo su muerte celular (3'). En las bacterias productoras de bacteriocina (3'), la proteína de inmunidad (I) se encuentra fuertemente asociada con el receptor de la bacteriocina para proteger al microorganismo productor de su actividad antimicrobiana. Fuente: Diep y col (2007).

### 2.2.3.5. Enterocina A

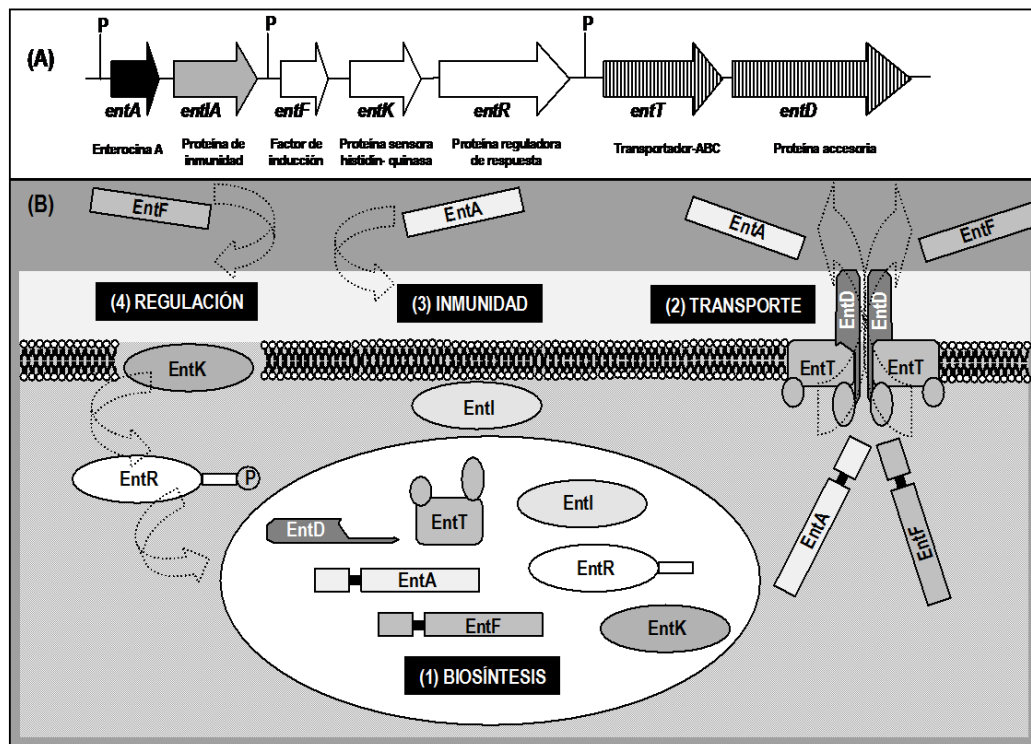
La enterocina A (EntA) es una bacteriocina identificada y caracterizada por primera vez a partir de las cepas *E. faecium* CTC492 y *E. faecium* T136, aisladas de embutidos crudos curados españoles (Aymerich y col., 1996; Casaus, 1998) aunque, posteriormente, se ha determinado que es una bacteriocina producida por cepas de *E. faecium* de distintos orígenes y de nichos ecológicos diferentes (Martín y col., 2006, Sánchez y col., 2007b; Stropfová y col., 2008; Brandao y col., 2010).

Como se deduce de su secuencia aminoacídica, la EntA es un péptido de 47 aminoácidos que, al igual que la PedA-1, posee la secuencia aminoacídica consenso YGNGV en las posiciones 8 a 12 de su extremo N-terminal. Los primeros cinco aminoácidos de su extremo N-terminal (TTHSG) no se han identificado en ninguna otra bacteriocina de la clase IIa (Holck y col., 1992). Además, la EntA posee dos residuos de cisteína (C) adicionales en las posiciones 29 y 47 de su secuencia aminoacídica, implicados en la formación de un segundo enlace disulfuro en su extremo C-terminal. Análisis informatizados de la estructura primaria de la EntA sugieren la presencia de secuencias transmembrana entre los residuos 26 y 43 de su secuencia aminoacídica aunque la existencia de un enlace disulfuro, entre las cisteínas (C) de las posiciones 29 y 47 podría dificultar su distribución en la membrana bacteriana.

Investigadores irlandeses han descrito una secuencia nucleotídica de 10,5 kilobases (kb) en el cromosoma de *E. faecium* DPC1146 (O’Keeffe y col., 1999) con, al menos, 12 marcos de lectura abiertos (ORF, del inglés *Open Reading Frames*) de los que, al menos 7 (*entA*, *entI*, *entF*, *entK*, *entR*, *entT* y *entD*) se encuentran implicados en la biosíntesis y regulación de la producción de la EntA (**Fig. 2.7.A**). Los siete genes se localizan coalineados en un único operon y, de ellos, cuatro (*entAITD*) son necesarios para la producción de EntA en hospedadores heterólogos (O’Keeffe y col., 1999). El gen estructural (*entA*) codifica un pre péptido de 65 aminoácidos en el que se reconoce, como en la mayoría de las bacteriocinas de la clase IIa, una secuencia líder (SL) de 18 aminoácidos con un lugar de procesamiento del tipo “doble glicina” y que será eliminada durante el procesamiento, transporte y secreción de la prebacteriocina, dando lugar a la EntA madura de 47 aminoácidos. A continuación, y en el mismo sentido de transcripción del gen *entA* se localiza el gen *entIA*, que codifica una proteína de inmunidad de 103 aminoácidos de gran homología con las proteínas de inmunidad de la LeuA (50%) y mesentericina Y105 (MesY105) (47%) (Aymerich y col., 1996; Eijsink y col., 1998; O’Keeffe y col., 1999). Los genes *entT* y *entD* codifican, respectivamente, las proteínas EntT y EntD que se corresponden con las de una proteína translocadora ATP-dependiente y su proteína accesoria necesarias para el procesamiento, transporte y secreción de péptidos y proteínas con secuencias líder del tipo “doble glicina”. La proteína EntT es similar a la de los transportadores-ABC de la CbnB2 (86%) y de la MesY105 (68%) mientras que la EntD manifiesta un 67% de homología con la proteína accesoria de la CbnB2 (CbnD) (O’Keeffe y col., 1999).

Conviene destacar, asimismo, que la síntesis de EntA se encuentra regulada por un sistema regulador de tres componentes codificados por los genes *entF*, *entK* y *entR* (**Fig. 2.7.B**). La proteína EntF de 48 aminoácidos actúa como factor de inducción (IF, del inglés *Induction Factor*) del sistema de regulación de la síntesis de EntA y muestra un 41% de identidad con el IF de la CbnB2 (Nilsen y col., 1998; O’Keeffe y col., 1999). El factor de inducción (IF) de la EntA se sintetiza con una secuencia líder (SL) del tipo “doble glicina” por lo que la eliminación de su SL por una peptidasa apropiada permitirá la externalización del IF maduro o activo (Brurberg y col., 1997; Franke, 1998; Nes y Eijsink, 1999). La mayoría de factores de inducción (IF) hasta ahora conocidos se diferencian de las bacteriocinas activas en que: (i) su longitud es menor, (ii) no suelen manifestar actividad antimicrobiana (Anderssen y col., 1998); (iii) la síntesis de algunas bacteriocinas se induce por ellas mismas como ocurre con la nisina A (NisA) y (iv), su actividad inductora ocurre a concentraciones muy pequeñas ya que, generalmente, los IFs con activos a concentraciones nanomolares a excepción del péptido EntF (inductor de la síntesis de la EntA) que es activo a concentraciones femtomolares (Nilsen y col., 1998). Igualmente, a continuación del gen *entF* y en el mismo sentido de transcripción se localizan los genes *entK* y *entR* que codifican la proteína sensora histidín-kinasa (EntK) y la proteína reguladora de respuesta (EntR), respectivamente. Actualmente el modelo propuesto para la regulación de la producción de EntA asume que las proteínas EntFRK y EntTD se expresan a niveles basales, lo que permite una acumulación del IF en el medio de cultivo. Sin embargo, cuando se alcanzan determinados niveles de la EntF se estimula la autofosforilación de la EntK, lo que activa a la

EntR. A continuación, la proteína EntR se une a secuencias nucleotídicas repetidas localizadas hacia arriba de los genes *entAIFRK* y *entTD* activando su transcripción y, por consiguiente, la producción de mayores cantidades de EntA (O’Keeffe y col., 1999).



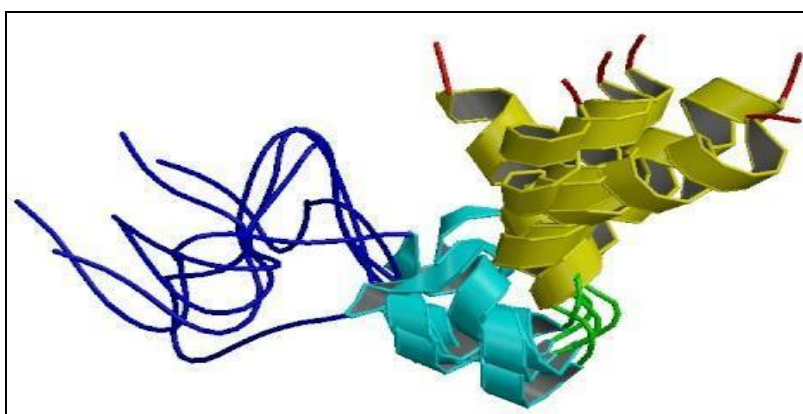
**Figura 2.7. (A)** Organización de los genes implicados en la biosíntesis de la enterocina A (EntA). La letra P representa los promotores que transcriben los diferentes genes. **(B)** Representación esquemática del procesamiento, transporte, secreción y regulación de la EntA. Los detalles se describen en el texto. Fuente: Martín (2006).

La EntA es una bacteriocina muy activa frente a microorganismos del género *Listeria* con una menor actividad antimicrobiana frente a otras bacterias Gram-positivas y, sobre todo, frente a otras BAL (Ennahar y Deschamps, 2000). Asimismo, la existencia de un segundo enlace disulfuro en su región aminoacídica C-terminal le dota de una mayor actividad antimicrobiana a rangos más amplios de pH lo que permite que la EntA inhiba, mayoritariamente, el desarrollo de microorganismos patógenos como *L. monocytogenes* permitiendo el desarrollo de otras BAL de interés, sobre todo, en alimentos fermentados (Fimland y col., 2000; Ennahar y Deschamps, 2000). La actividad antimicrobiana de la EntA se ha evaluado añadiendo directamente a los alimentos la cepa productora de la bacteriocina (Aymerich y col., 2000a; 2002; Liu y col., 2008; Izquierdo y col., 2009) o adicionando a los alimentos la bacteriocina, purificada o parcialmente purificada, con o sin otros tratamientos complementarios como el calor o elevadas presiones hidrostáticas (Aymerich y col., 2000b; Garriga y col., 2002; Marcos y col., 2008).

### 2.2.3.6. Sakacina A

La producción de la bacteriocina sakacina A (SakA) (**Fig. 2.8.**) se determinó primero en los sobrenadantes de la cepa de *Lb. sakei* Lb706 en el marco de un estudio con otras 221 BAL aisladas de carne y productos cárnicos como salchichas tipo Bolonia o Frankfurt (Schillinger y Lücke, 1990). Recientemente, la producción de SakA se ha evaluado también en *Lb. sakei* DSMZ 6333 (Trinetta y col., 2012) y *Lb. sakei* MBSa1 (Barbosa y col., 2014).

La SakA está constituida por una cadena peptídica de 41 aminoácidos con una masa molecular teórica de 4.308,7 daltons (Da), con una región N-terminal hidrofílica cargada positivamente y con la secuencia aminoacídica consenso típica de las bacteriocinas de la clase IIa entre las posiciones 4 y 8 de su cadena aminoacídica. La SakA posee también una región C-terminal con aminoácidos hidrofóbicos, separados por los aminoácidos hidrofílicos glicina (G) y Ser (S) (Holck y col., 1992). Es interesante destacar que la secuencia aminoacídica de la SakA es idéntica a la de la bacteriocina CurA producida por *Lb. curvatus* LTH1174, microorganismo aislado de salchichas frescas (Tichaczek y col., 1992; Tichaczek y col., 1993) y ambas poseen dos cisteínas (C) en las posiciones 10 y 15 de su cadena aminoacídica implicadas en la formación de un puente disulfuro.



**Figura 2.8.** Imagen de la sakacina A obtenida mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Fuente: Bactibase.

El locus *sap*, responsable de la producción de la SakA por *Lb. sakei* Lb706 se localiza en un plásmido de 60 kb denominado pLSA60 que contiene, además, los genes *sapAIPhKRTE* del operon de la SakA. El gen *sapA* codifica el precursor de 59 aminoácidos de la SakA con una SL (SL<sub>sapA</sub>) de 18 amino ácidos seguido de la secuencia de 41 aminoácidos de la bacteriocina madura (SakA), mientras el gen *saiA* codifica la proteína de inmunidad (SakI), de 90 aminoácidos. La síntesis de SakA por *Lb. sakei* Lb706 es termo-sensible y regulado por un factor de inducción (IF) mediante un sistema de regulación de tres componentes (Diep y col., 2000). En este sentido, se conoce que los genes *sap-Ph*, *sapK* y *sapR* codifican el péptido inductor (IF), la proteína histidín-quinasa (SapK) y la proteína reguladora de respuesta (SapR), respectivamente. Por último, los genes *sapT* y *sapE* codifican una proteína ABC-transportadora (SapT) y su proteína accesoria (SapE) (Axelsson y col., 1993; Axelsson y Holck, 1995; Diep y col., 2000).

El espectro de inhibición de la SakA incluye desde especies del género *Listeria* a otras BAL como algunos lactobacilos, enterococos y carnobacterias. Sin embargo, la SakA no manifiesta actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus* o *Clostridium* ni frente bacterias Gram-negativas como *Escherichia spp.* o *Yersinia spp.* (Okereke y Montville, 1991; Jones y col., 2009). Debido a su utilización como cultivo iniciador en productos cárnicos las cepas de *Lb. sakei*, productoras de SakA, manifiestan un importante potencial biotecnológico para el control de diferentes especies de *Listeria* en numerosos derivados cárnicos (Hartmann y col., 2011).

### 2.2.3.7. Bacteriocina E50-52

Durante los últimos años el esfuerzo por identificar bacteriocinas y péptidos antimicrobianos de diverso origen con actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas ha conducido al desarrollo de tecnologías como la síntesis microbiana de péptidos híbridos antimicrobianos (Acuña y col., 2012) y a la búsqueda exhaustiva de nuevas bacteriocinas con dicha capacidad. Una de las bacteriocinas identificadas es la bacteriocina E50-52 (BacE50-52) producida por *E. faecium* B-30746, aislado del intestino de pollos (Svetoch y col., 2008a).

Su reciente descubrimiento así como su más que probable futura aplicación comercial, origina que la información dada por sus descubridores acerca de la caracterización genética y bioquímica de la BacE50-52 sea escasa. De la información publicada, se deduce que dicha bacteriocina está constituida por una cadena peptídica catiónica de 39 aminoácidos con la secuencia aminoacídica consenso conocida de las bacteriocinas de la clase IIa en las posiciones 5 y 9 de su secuencia aminoacídica y con una masa molecular teórica de 4.125 Da. Sin embargo, aún cuando la bacteriocina ha sido prurificada a homogeneidad su masa molecular, determinada por espectrometría de masas (MALDI-TOF MS), es menor de la deducida de la secuencia aminoacídica resultante (Svetoch y col., 2008a,b y 2010). No obstante, resultados recientes sugieren que dicha bacteriocina manifiesta cierta actividad antimicrobiana cuando se produce por células recombinantes de *E. coli* (Wang y col., 2013).

Se ha descrito que el espectro de actividad antimicrobiana de la BacE50-52 incluye bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, incluyendo diversas especies de *Listeria*, *Salmonella*, *Shigella* e incluso *E. coli* O157:H7. De hecho, los mejores resultados se refieren su eficacia para controlar el desarrollo de *C. jejuni* y *S. enteritidis* en pollos de engorde. El suministro de BacE50-52 purificada a gallinas ponedoras adultas y pollitos de engorde jóvenes, originó la desaparición de *C. jejuni* y una drástica reducción de *S. enteritidis* en sus intestinos. Por ello, la identificación de otras bacteriocinas con características similares a la BacE50-52 ha impulsado su estudio para su posible utilización comercial en el control de *Campylobacter spp.* en aves de corral y pollitos de engorde (Svetoch y col. 2005; Sosunov y col., 2007; Jun Lin, 2009; Hermans y col., 2011; Doyle y Erickson, 2012).



### **2.2.3.8. Diseño de genes sintéticos que codifican la síntesis microbiana de bacteriocinas**

El diseño de genes sintéticos, deducidos de la secuencia aminoacídica conocida de bacteriocinas descritas podría constituir una herramienta útil para la producción y expresión funcional de bacteriocinas por diversos microorganismos hospedadores, cuando la secuencia nucleotídica que codifica una bacteriocina previamente descrita no se encuentra disponible o es difícil de conseguir (Chang y col., 2006; Denis-Quanquin y col., 2007). Igualmente, el diseño de genes sintéticos con el codon de uso preferido para la síntesis de proteínas o péptidos por cada microorganismo productor seleccionado podría facilitar la síntesis, procesamiento, transporte y secreción de la bacteriocina de interés lo que, a su vez, podría conducir a un incremento en la concentración de la bacteriocina producida, purificada y recuperada (Lin y col., 2002; Hang y col., 2010; Öberg y col., 2011; Gao y col., 2012).

El diseño de genes sintéticos ha permitido la síntesis y producción de la divercina RV41 (DvnRV41) por células recombinantes de *E. coli* (Richard y col., 2009). Sin embargo, el diseño y evaluación de genes sintéticos que permitan la producción biológica de bacteriocinas por otros microorganismos productores como las levaduras, podría permitir un incremento significativo de la producción biológica de bacteriocinas para su posible empleo como péptidos antimicrobianos naturales por la industria alimentaria, en medicina humana y veterinaria y en producción animal.

### **2.2.4. BACTERIOCINAS SINTETIZADAS SIN SECUENCIA LIDER O PÉPTIDO SEÑAL**

Como se ha descrito previamente se conoce que algunas bacteriocinas producidas por BAL se sintetizan sin una extensión N-terminal (ni secuencia líder ni péptido señal) como la enterocina L50 (EntL50A y EntL50B) (Cintas y col., 1998), enterocina Q (EntQ) (Cintas y col., 2000c; Criado y col., 2006a), bacteriocina LsbB (Gajic y col., 2003), enterocina EJ97 (EntEJ97) (Gálvez y col., 1998; Sánchez-Hidalgo y col., 2003) y weissellicina Y (WeLY) y weissellicina M (WeLM) (Masuda y col., 2012). En algunas clasificaciones, las bacteriocinas sintetizadas sin una extensión N-terminal se consideran una clase diferente (Franz y col., 2007). Sin embargo, en la clasificación empleada en esta memoria las bacteriocinas sintetizadas sin secuencia líder (SL) o péptido señal (PS) se engloban dentro de la clase IId (Cotter y col., 2005a).

De las bacteriocinas sintetizadas si una extensión N-terminal, la EntL50 (EntL50A y EntL50B) fué la primera bacteriocina caracterizada de este grupo (Cintas y col., 1998). La EntL50 es una bacteriocina codificada por los genes *entL50A* y *entL50B* localizados colinealmente y separados por un pequeño espacio intergénico (<30-pares de bases (pb), con una única unidad de transcripción y cuya actividad antimicrobiana radica en la de dos péptidos con actividad antimicrobiana individual pero sinérgicos entre sí. Sin embargo, la EntQ, la bacteriocina LsbB y la EntEJ97 son bacteriocinas codificadas por genes no asociados colinealmente con otros productores de péptidos aunque su actividad

antimicrobiana es solamente individual y no sinérgica. La mayoría de las bacteriocinas sintetizadas sin una extensión N-terminal poseen residuos de lisina (K) en las posiciones 10 y 21 de su secuencia aminoacídica (**Tabla 2.2.**). Igualmente, aunque los mecanismos moleculares que rigen su procesamiento, transporte y secreción no se conocen bien, excepto para la bacteriocina LsbB producida por *L. lactis* BGM-1 (Gajic y col., 2003) y la EntQ, producida por *E. faecium* L50 (Cintas y col., 2000c; Criado y col., 2006a), posiblemente se secreten mediante sistemas de transporte dedicados del tipo transportadores-ABC o de transportadores-ABC de resistencia a otros compuestos biológicamente activos (MDR) (del inglés, *Multidrug Resistance Transporters*).

La EntL50 es una bacteriocina producida por *E. faecium* L50 (Cintas y col., 1998) y por otros enterococos de las especies *E. faecium* (Moreno y col., 2002; Achemchem y col., 2005; Martín y col., 2006; Sánchez y col., 2007a; Theppangna y col., 2007) y *E. durans* (Batdorj y col., 2006), aislados de nichos ecológicos o ecosistemas muy diferentes. También se conoce que los determinantes genéticos que codifican la EntL50 (EntL50A y EntL50B) de *E. faecium* L50 se encuentran en un plásmido de 50 kb denominado pCIZ1 (Cintas y col., 1998; Criado y col., 2006a). La EntL50 consiste de dos péptidos, EntL50A y EntL50B de 44 y 43 aminoácidos, respectivamente, con actividad antimicrobiana individual y efecto sinérgico cuando se combinan. Aunque ambos péptidos poseen 21 aminoácidos en común y una homología del 72%, la actividad antimicrobiana individual de la EntL50A es mayor que la de la EntL50B. La EntL50 manifiesta un amplio espectro antimicrobiano inhibiendo bacterias de los géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Pediococcus*, así como otros microorganismos patógenos como *L. monocytogenes* y *B. cereus* (Cintas y col., 1998).

Además de la EntL50 (EntL50A y EntL50B), el aislado *E. faecium* L50 produce la enterocina P (EntP) y la EntQ, ésta última también sintetizada sin una extensión N-terminal (Cintas y col., 2000c). La EntQ es una bacteriocina relativamente pequeña (34 aminoácidos) y, aunque no contiene la secuencia consenso YGNGV posee dos residuos de cisteína (C) en las posiciones 26 y 34 de su secuencia aminoacídica, lo que sugiere la posible formación de un puente disulfuro en su región C-terminal, a diferencia de lo que ocurre con otras bacteriocinas que poseen dicho enlace en la región N-terminal (EntP) o en ambas regiones (N-terminal y C-terminal) como ocurre con la bacteriocina PedA-1. Igualmente, en *E. faecium* L50, el gen estructural de la EntQ (*entqA*) se localiza en un plásmido de 7.383 pb, denominado pCIZ2, precedido por dos genes orientados en sentido inverso respecto al anterior (*entqB* y *entqC*) (Criado y col., 2006a). Estudios recientes han determinado que la proteína EntqB es similar a los transportadores-ABC de otras bacteriocinas mientras que la proteína EntqC no muestra homología significativa con ninguna otra proteína o péptido conocido. Estudios bioquímicos y genéticos han confirmado que la EntqB es la responsable del procesamiento, transporte y secreción de la EntQ al medio extracelular, mientras la proteína EntqC le confiere inmunidad a dicha bacteriocina (Criado y col., 2006a).

**Tabla 2.2.** Secuencia aminoacídica de algunas bacteriocinas sintetizadas sin secuencia líder o péptido señal

Bacteriocina	Secuencia aminoacídica
Enterocina L50A	MGAI AKLVAKFGWP I V K K Y Y K Q I M Q F I G E G W A I N K I I E W I K K H I
Enterocina MR10A	MGAI AKLVAKFGWP I V K K Y Y K Q I M Q F I G E G W A I N K I I D W I K K H I
Enterocina NA	MGAI AKLVAKFGWP I V K K Y Y K Q I M Q F I G E G W A I N K I I D W I K K H I
Enterocina 7A	MGAI AKLVAKFGWP I V K K Y Y K Q I M Q F I G E G W A I N K I I D W I K K H I
Enterocina I	MGAI AKLVAKFGWP I V K K Y Y K Q I M Q F I G E G W A I N K I I E W I K K H I
Enterocina 62-6A	MGAI AKLVAKFGWP I V K K Y Y K Q I M Q F I G E G W A I N K I I E W I K K H I
Enterocina RJ-11	APAGLVAKFGRP I V K K Y Y K Q I M Q F I G E G S A I N K I I P W I A R M W R T
Enterocina L50B	MGAI AKLVTKFGWPL I K K F Y K Q I M Q F I G Q G W T I D Q I E K W L K R H
Enterocina MR10B	MGAI AKLVAKFGWPF I K K F Y K Q I M Q F I G Q G W T I D Q I E K W L K R H
Enterocina Q	MNFLKNGIAKWM TGAELQAYKKYGC L PWEKISC
Enterocina EJ97	MLAKIKAMIKKFPNPYTLAAKLT TTYEINWYKQYGRYPWERPVA
Bacteriocina LsbB	MKTILRFVAGYDIASHKKKTGGYPWERGKA

Los residuos aminoacídicos conservados en las bacteriocinas sintetizadas sin secuencia líder ni péptido señal se muestran en color azul, excepto en la bacteriocina LsbB. Adaptado de Franz y col., (2007).

La EntEJ97 es otra bacteriocina, sintetizada sin secuencia líder ni péptido señal, producida por *E. faecalis* EJ97 aislado de aguas residuales urbanas. Esta bacteriocina, con una masa molecular de 5.340 Da muestra actividad antimicrobiana frente a especies del género *Bacillus*, *Enterococcus* y *Listeria*, así como frente a cepas de *S. aureus* (Gálvez y col., 1998). En *E. faecalis* EJ97, los genes responsables de la producción de la EntEJ97 se localizan en un plásmido conjugativo inducible por feromonas de 60 kb denominado pEJ97, y su gen estructural codifica un péptido de 44 aminoácidos que carece de extensión N-terminal. Además, se han identificado genes próximos al mencionado gen estructural que, posiblemente, codifican proteínas del tipo transportadores-ABC que estarían involucradas en su procesamiento, transporte y secreción (Sánchez-Hidalgo y col., 2003). La EntEJ97 manifiesta una cierta homología con otras bacteriocinas que se sintetizan sin SL o PS, incluyendo los tres residuos conservados de lisina (K) en las posiciones 6, 10 y 21, el residuo conservado de isoleucina (I) en la posición 21, así como el residuo conservado de triptófano (W) en la posición 39, al final de su región C-terminal. No obstante, aún se desconoce la posible relación la estructura-función debida a la presencia de residuos aminoacídicos conservados en la secuencia aminoacídica esta bacteriocina.

La bacteriocina LsbB es otra de las bacteriocinas de la clase IId, producida por *L. lactis*, sintetizada sin una SL o PS, con un espectro antimicrobiano reducido y cuya secuencia aminoacídica completa es de sólo 30 aminoácidos. Curiosamente, dicha bacteriocina se sintetiza conjuntamente con la bacteriocina LsbA que, por el contrario, sí posee una extensión N-terminal aunque de características singulares (Gajic y col., 2003). Los genes que codifican ambas bacteriocinas, *lsbA* y *lsbB*, se encuentran uno a continuación del otro, separados por unos pocos nucleótidos y en hebras opuestas. A continuación de *lsbB* y en el mismo sentido de transcripción que *lsbA* se encuentra el gen *lmrB* que codifica la proteína LmrB, miembro de la familia de los transportadores-ABC e implicada en el transporte y la inmunidad de ambas bacteriocinas, LsbA y LsbB (Gajic y col., 2003).

## 2.3. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE BACTERIOCINAS

La producción heteróloga de bacteriocinas biológicamente activas por microorganismos procariotas y/o eucariotas permite, la mayoría de las veces, una mayor producción de bacteriocinas, modificaciones postraduccionales adecuadas, un incremento de su actividad antimicrobiana y mejores rendimientos de purificación. De esta manera, la producción de bacteriocinas de elevado potencial biotecnológico y producidas por bacterias con un cierto potencial patógeno podrían producirse por hospedadores microbianos más seguros, que las produjesen en mayores cantidades y con una mayor actividad antimicrobiana específica.

### 2.3.1. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE BACTERIOCINAS POR BACTERIAS LÁCTICAS (BAL)

El que la mayoría de las bacteriocinas se sinteticen con extensiones N-terminales homólogas ha conducido a la hipótesis de que sus sistemas de procesamiento y secreción pudieran ser intercambiables. Por ello, los esfuerzos de muchos grupos investigadores se han dirigido hacia la producción heteróloga de bacteriocinas mediante el intercambio de secuencias líder (SL) y/o de genes del sistema de transporte dedicado (DTS), así como por el intercambio de las secuencias líder (SL) por péptidos señal (PS), reconocidos por la ruta general de secreción (GSP) o sistema Sec-dependiente.

#### 2.3.1.1. Producción heteróloga de bacteriocinas basada en el intercambio de secuencias líder (SL) y/o de genes del sistema transportador-ABC o sistema de transporte dedicado (DTS)

El que las extensiones N-terminales de muchas bacteriocinas sean del tipo secuencia líder (SL) con una doble glicina (GG) en posición -1 y -2 del lugar de corte por la peptidasa señal, permite determinar que las SL funcionan como lugar de reconocimiento para el sistema transportador-ABC que, a su vez, las elimina durante el procesamiento y secreción de la bacteriocina madura al exterior celular. Igualmente, dicho reconocimiento permite hipotetizar la posibilidad de intercambio de una secuencia líder (SL) por otra homóloga o la construcción de quimeras génicas de la SL de una bacteriocina fusionada a la región madura de otra, lo que permitirá la producción heteróloga de la forma madura de muchas bacteriocinas en otros hospedadores (Håvarstein y col., 1995; Van Belkum, y col., 1997).

Basándose en la homología reconocida entre la extensión N-terminal de la lactacina F (LacF), producida por *Lb. johnsonii* VPI 11088, con las de la CbnA, CbnBM1 y CbnBM2, producidas de *Cb. piscicola* LV17, Allison y col., (1995b) transformaron células competentes de *Cb. piscicola* LV17 con el plásmido pTRK386, donde se clonaron los genes del operón de la LacF y determinaron que la cepa recombinante producía, simultáneamente, la LacF y las carnobacteriocinas CbnA, CbnBM1 y CbnBM2. De esta manera, se demostraba que la SL de la LacF era reconocida por el sistema de procesamiento y secreción de las carnobacteriocinas CbnA, CbnBM1 y CbnBM2. No obstante, la cantidad de LacF producida fue inferior a la de la cepa silvestre lo que, posiblemente, se debiese a una menor expresión génica al encontrarse

el gen responsable de su síntesis en un hospedador heterólogo o a que la SL de la LacF competía ineficazmente con la de las carnobacteriocinas por su procesamiento, transporte y secreción (van Belkum y col., 1997; Rodríguez y col., 2002). Otros estudios demostraron que cuando la SL de la LeuA, lactococina A (LcnA) y ColV se fusionaba a la región madura de la divergicina A (DvnA), una bacteriocina secretada por la ruta general de secreción y se introducían, mediante un vector de expresión proteica en *Lc. gelidum*, *L. lactis* y *E. coli*, cepas que a su vez poseen los genes del sistema dedicado de transporte (DTS) de la LeuA, LacA y ColV, respectivamente, la mayor producción de DvnA se alcanzaba cuando la secuencia líder (SL) era homóloga a las de las bacteriocinas procesadas y secretadas por el sistema de transporte dedicado (DTS) del hospedador. De todas maneras, algunas secuencias líder (SL) no eran capaces de dirigir la secreción de la DvnA, lo que sugiere que algunas SL no son reconocidas por el dominio proteolítico de los transportadores-ABC heterólogos (Worobo y col., 1995; van Belkum y col., 1997).

Otros investigadores también determinaron que la PedA-1, producida por *P. acidilactici* 347 y la LcnA producida por *L. lactis* subsp. *lactis diacetylactis* WM4, mostraban características apropiadas para intercambiar sus secuencias líder (SL) y para ser procesadas y secretadas por transportadores-ABC heterólogos (Horn y col., 1998). Dichos investigadores diseñaron un vector (pFI2126), que contenía el promotor de la LcnA y la SL de la LcnA fusionada a la PedA-1 madura, y lo transfirieron a la cepa de *L. lactis* IL1403, que posee en su cromosoma genes homólogos (*lcnC'* y *lcnD'*) a los que codifican las proteínas de procesamiento, transporte y secreción de la LcnA. Las cepas recombinantes produjeron PedA-1 con una actividad antimicrobiana de, aproximadamente, el 25% de la observada por la PedA-1 producida por *P. acidilactici* 347. Este sistema heterólogo de producción fue mejorado al introducir en el mismo plásmido los genes de procesamiento, transporte y secreción de la LcnA (genes *lcnCD*) (pFI2160), lo que permitió en las cepas hospedadoras una producción de PedA-1 similar a la de *P. acidilactici* 347. En este mismo estudio la transformación de *L. lactis* FI5876, una cepa productora de NisA, con el plásmido pFI2160 permitió la coproducción de NisA y PedA-1 por la cepa recombinante de *L. lactis* FI9267. Aunque *L. lactis* FI9267 produjo la misma cantidad de NisA que la cepa original, la producción de PedA-1 fue inferior a la esperada (Horn y col., 1999).

Posteriormente, Horn y col., (2004) han desarrollado un sistema de expresión que permite la producción de la PedA-1 y ColV bajo el control del promotor inducible de la NisA ( $P_{nisA}$ ), en cepas de *L. lactis* FI7847 y *L. lactis* FI5876, esta última productora de NisA. El sistema es de dos plásmidos, uno de ellos con el  $P_{nisA}$  y la quimera génica “SL de LcnA / PedA-1 madura” o “SL de LcnA / ColV madura” (pFI2391 y pFI2436, respectivamente) y, el otro, con los genes *lcnCD* (pFI2148). Ambos plásmidos se transformaron en células competentes de *L. lactis*, observándose que la producción de PedA-1 representaba un 20-30% de la producida por la cepa de *P. acidilactici* 347, mientras que la de ColV representaba un 25-35% de la producida por *E. coli* ATCC 14763. Por otro lado, la producción de NisA se mantuvo en los mismos niveles en la cepa recombinante que en la original. Un sistema similar al descrito se ha desarrollado por Fernández y col., (2004) para la producción de LcnA y NisA. Igualmente, Arqués y col., (2008) han incorporado en un mismo vector de expresión

la quimera génica “SL de LcnA / PedA-1 madura”, los genes *lcnCD* de procesamiento, transporte y secreción de la LcnA y el gen de inmunidad de la PedA-1 (*pedB*), transfiriendo dicho plásmido a diferentes lactococos, productores y no productores de NisA. Los resultados obtenidos demuestran que la presencia del gen *pedB* en el vector de expresión proteica mejora la actividad antimicrobiana de la PedA-1 en las cepas que lo expresan con respecto a las que no lo expresan. De hecho, dichos investigadores han conseguido cepas recombinantes productoras de NisA y de PedA-1 con una actividad antimicrobiana similar a la de *P. acidilactici* 347.

Otros investigadores también han evaluado la producción y coproducción de la PedA-1 y EntA en cepas de *L. lactis* IL1403 con los genes homólogos del sistema de procesado, transporte y secreción de la LcnA (*lcnC'D'*) (Martínez y col., 2000). La clonación del gen estructural (*pedA*) y de inmunidad (*pedB*) de la PedA-1 bajo el control del promotor constitutivo  $P_{32}$  en el vector de expresión pMG36c originó el plásmido recombinante pJM03. Dichos genes se introdujeron también en el vector de expresión pHB04, un plásmido derivado de pMG36c con el gen estructural (*entA*) y de inmunidad (*entiA*) de la EntA bajo el control del promotor  $P_{32}$  originando el plásmido recombinante pJM04. La transformación de *L. lactis* IL1403 con los plásmidos pJM03 (*pedA:pedB*), pHB04 (*entA:entiA*) y pJM04 (*entA:entiA:pedA:pedB*) permitió la producción independiente de EntA y PedA-1 y la coproducción de ambas bacteriocinas en *L. lactis* IL1403. La producción de EntA y PedA-1 en los sobrenadantes de *L. lactis* IL1403 (pHB04) y *L. lactis* IL1403 (pJM03) representó un 4-8% de la producida por las cepas de *E. faecium* T136 y *P. acidilactici* 347, respectivamente. La co-producción de EntA y PedA-1 en *L. lactis* (pJM04) tampoco mejoró la producción de las dos bacteriocinas respecto a la de las cepas productoras silvestres. Es posible que la baja producción de EntA y PedA-1 por las cepas recombinantes de *L. lactis* se deba a la existencia de una sola copia de los genes *lcnC'D'* localizados en el cromosoma bacteriano y/o a que los productos de ambos genes no reconozcan eficazmente la extensión N-terminal que contiene las secuencias líder (SL) de la EntA y PedA-1, necesarias para su procesamiento y secreción (Martínez y col., 2000).

Morriset y Frére (2002) también han conseguido la producción heteróloga de la PedA-1 mediante la construcción de un vector que contiene el gen híbrido “SL de la MesY105 / PedA-1 madura” y los genes de procesamiento y secreción de la MesY105 (*mesCDE*). La transformación de *Lc. mesenteroides* con el plásmido recombinante se tradujo en niveles de producción de PedA-1, similares a los del pediococo original.

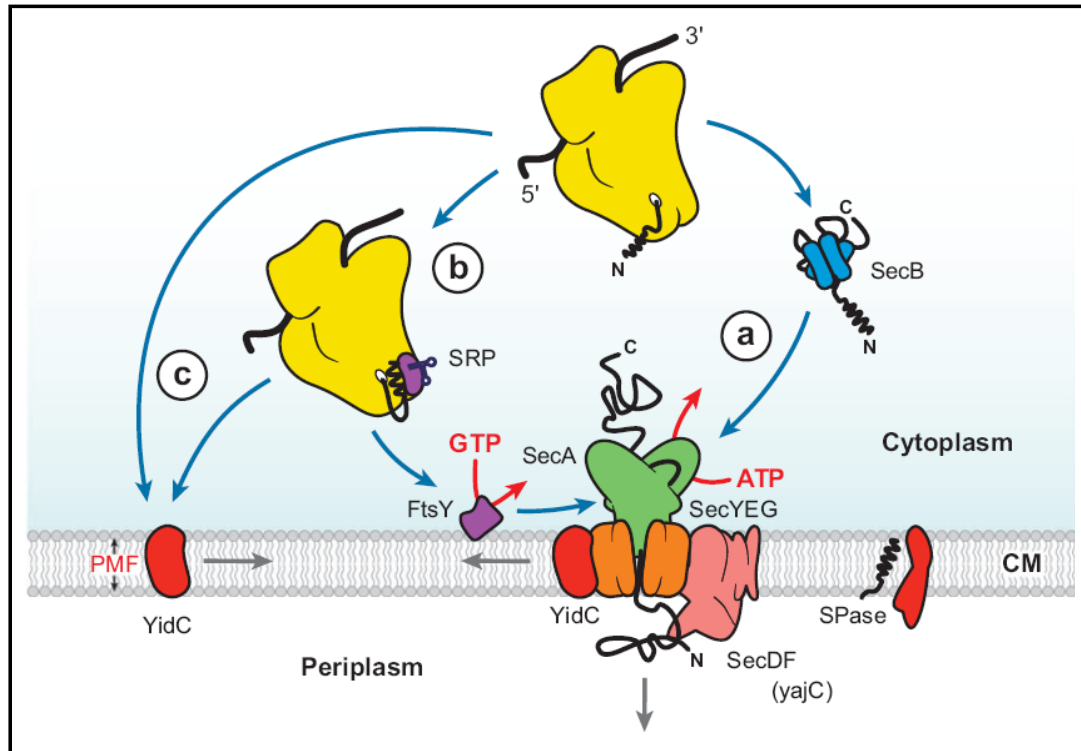
También cabe destacar el desarrollo y evaluación de un modelo de expresión para la producción heteróloga de bacteriocinas en *Lb. sakei* Lb790, basado en el empleo de los genes de síntesis, regulación transcripcional, procesamiento y secreción de la SakA de *Lb. sakei* Lb706 (genes *orf4sapKRTE*) (Axelsson y col., 1998b). Para ello, dichos investigadores transformaron la cepa de *Lb. sakei* Lb790 con dos plásmidos recombinantes. El primero de ellos (pSAK20) contenía los genes del promotor de SakA, así como los de procesamiento y secreción del precursor de la SakA mientras que, el segundo, contenía el gen estructural y de inmunidad de la SakP de *Lb. sakei* Lb674. Cuando la PedA-1, producida por *P. acidilactici*

PAC1.0 o la piscicolina 61 (P61), producida por *Cb. piscicola* LV61, se colocaron bajo el control de sus promotores se originaron los plásmidos pSPP1, pPED1 o pPSC1, respectivamente, mientras que cuando ambos genes se colocaron bajo el control del promotor de la SakA se obtuvieron los plásmidos pSPP2, pPED2 o pPSC2, respectivamente. Además, estos autores construyeron otro plásmido (pSPP3) que portaba la fusión “SL de la SakA / SakP madura” y el gen de inmunidad de la SakP. La introducción de los plásmidos pSPP2, pSPP3, pPED2, pPSC1 y pPSC2 en *Lb. sakei* Lb790 (pSAK20) permitió la producción de SakP, PedA-1 y P61 en cantidades similares o incluso, superiores, a la producida por las cepas silvestres originales.

### **2.3.1.2. Producción heteróloga de bacteriocinas basada en la fusión de la bacteriocina a un PS reconocido por la GSP o sistema SEC-dependiente.**

Al contrario de lo que ocurre con la mayoría de las bacteriocinas producidas por BAL las cuales son procesadas, transportadas y secretadas mediante transportadores-ABC o sistemas de transporte dedicados (DTS), solamente unas pocas bacteriocinas como la acidocina B (AcdB), DvnA, bacteriocina 31 (Bac31), EntP, lactococina 972 (Lcn972), enterolisina A (EnlA) y la hiracina JM79 (HirJM79) se sintetizan con extensiones N-terminales que codifican un péptido señal (PS) reconocido por la ruta general de secreción (GSP) o sistema Sec-dependiente (**Fig. 2.9.**) Así pues, dado que las bacteriocinas sintetizadas con un PS no requieren genes específicos para su procesamiento, transporte y secreción, resulta de gran interés determinar si su PS es reconocido eficazmente por otras bacterias hospedadoras, así como si el intercambio de la secuencia líder (SL) de una bacteriocina por el péptido señal (PS) de otra permite el procesamiento, transporte y secreción de la bacteriocina por componentes de la ruta general de secreción (GSP) o sistema Sec-dependiente.

La DvnA, producida por *Cb. divergens* LV13, fue la primera bacteriocina descrita con un PS (Worobo y col., 1995). Por ello, los trabajos iniciales de producción heteróloga de bacteriocinas, basados en el intercambio de una SL por un PS teniendo como hospedadores heterólogos a otras BAL, se basaron en la fusión del PS de la DvnA a la secuencia nucleotídica de la bacteriocina madura de interés. La construcción de vectores de expresión proteica conteniendo el gen estructural (*dvnA*) y de inmunidad (*dviA*) de la DvnA y su transferencia a *Cb. piscicola* y *L. lactis* permitió la producción y secreción de DvnA por las BAL transformadas, lo que sugirió que los componentes de su ruta general de secreción (GSP) o sistema Sec-dependiente eran responsables del procesamiento, transporte y secreción de la DvnA biológicamente activa (Worobo y col., 1995).



**Figura 2.9.** Transporte y secreción de proteínas mediante la ruta general de secreción (GSP) y una translocasa Sec-dependiente. La translocasa Sec-dependiente bacteriana comprende un complejo proteico de la membrana citoplasmática formado por un dominio móvil periférico SecA (verde), la proteína formadora del canal conductor SecYEG (naranja) y las proteínas accesorias SecDF (naranja oscuro) e YidC (rojo). La peptidasa señal (SPase)(rojo) es una peptidasa asociada a la membrana citoplasmática que libera el SP de la preproteína en la cara exterior de la membrana. (a) Modelo post-traduccional. Las proteínas para secretar al medio extracelular (negro) se unen, postraduccionalmente, a la chaperona SecB (azul) que facilita su unión a la translocasa por la afinidad de SecB con la proteína SecA. (b) Modelo co-traduccional. Las proteínas de membrana y algunas preproteínas se unen co-traduccionalmente a la translocasa por medio de la unión del ribosoma (amarillo) a la partícula reconocedora del péptido señal (SRP) que, a su vez, se une a la proteína receptora FtsY (morado). (c) Algunas proteínas de membrana se insertan en la membrana citoplasmática directamente a través de YidC. PMF es la Fuerza Protón Motriz (del inglés, *Proton Motive Force*). Fuente: Driessen y Nouwen, (2008).

También se conoce que fusiones del péptido señal de la DvnA ( $PS_{dvnA}$ ) a otras bacteriocinas como la CbnB2 (McCormick y col., 1996), MesY105 (Biet y col., 1998), ColV (McCormick y col., 1999), enterocina B (EntB) (Franz y col., 1999b) y brococina C (BroC) (Bohaychuk y col., 1999) han permitido la producción de estas bacteriocinas en los sobrenadantes de las BAL productoras a través de su ruta general de secreción (GSP) o sistema Sec-dependiente. Igualmente, con el fin de comparar la producción de MesY, bajo el control de la GSP con la del sistema DTS mediado por transportadores-ABC específicos, se han utilizado dos vectores de expresión proteica diferentes (Biet y col., 1998). Uno de ellos, contenía la fusión del  $PS_{dvnA}$  al gen estructural (*mesY*) y al hipotético gen de inmunidad (*mesI*) de la MesY105 (pFBYC07) mientras, el otro, contenía los genes biosintéticos y de procesamiento, transporte y secreción de la MesY105 (*mesYICDE*). Cuando ambos vectores se transfirieron a células competentes de *Lc. mesenteroides* DSM20484 y *Lc. cremoris* LC, se



observó que la producción de MesY105 bajo el control de un sistema DTS era cuatro veces mayor que la obtenida por la GSP o sistema Sec-dependiente.

Como ya se ha considerado por otros investigadores tampoco se comprende bien como la mayor parte de las bacteriocinas producidas por BAL poseen sistemas específicos de procesamiento, transporte y secreción (DTS) cuando acceden a la ruta general de secreción (GSP) o sistema Sec-dependiente con un péptido señal (PS) adecuado (McCormick y col., 1996). Posiblemente, ello se deba a que los sistemas dedicados (DTS) son más eficaces que los generales (GSP) (Biet y col., 1998). No obstante, dicha hipótesis procede solamente de resultados obtenidos con el PS<sub>dvnA</sub> fusionado a la forma madura de otras bacteriocinas que poseen una secuencia N-terminal diferente a la de la DvnA madura y cuyo procesamiento, transporte y secreción se realiza en hospedadores que puede que no reconozcan eficazmente su lugar de procesamiento y secreción. Por ello, generalizar que los sistemas dedicados (DTS) son más eficaces para la producción heteróloga de bacteriocinas que los que emplean componentes de la ruta general de secreción (GSP) o sistema Sec-dependiente constituye una hipótesis, cuanto menos, poco contrastada experimentalmente.

Trabajos desarrollados por nuestro equipo investigador han demostrado la eficacia de la producción de la bacteriocina Sec-dependiente EntP, producida por *E. faecium* P13 (Cintas y col., 1997), en otros hospedadores como *E. coli* (Gutiérrez y col., 2005a), *Methylobacterium extorquens* (Gutiérrez y col., 2005b) y *L. lactis* (Herranz y Driessen, 2005; Gutiérrez y col., 2006). La clonación del gen estructural de la EntP (*entP*), con o sin su gen de inmunidad (*entiP*), en (i) el plásmido pMG36c bajo el control de un promotor constitutivo, (ii) en el plásmido pNZ8048 bajo el control del promotor inducible P<sub>nisA</sub>, y (iii) en el vector de integración en el genoma bacteriano pINT29, así como la transferencia de los vectores resultantes a células competentes de *L. lactis*, demostró la producción de EntP en los sobrenadantes de las cepas hospedadoras de *L. lactis* IL1403 y *L. lactis* NZ9000, así como la coproducción de EntP y NisA por *L. lactis* DPC5598. La clonación de solamente *entP* en los vectores de expresión proteica utilizados constituyó el requisito mínimo para la producción de EntP biológicamente activa. La producción de EntP pudo cuantificarse mediante anticuerpos policlonales específicos anti-EntP y la utilización de las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA, del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) apropiadas, determinándose que las diferencias en la producción de EntP dependían del vector empleado, de la cepa hospedadora y de la presencia/ausencia del gen de inmunidad *entiP* en los vectores de expresión proteica. Las cepas de *L. lactis* IL1403 y *L. lactis* NZ9000, transformadas con vectores de expresión conteniendo los genes *entP* y *entiP* fueron las que produjeron mayores cantidades de EntP, con producciones incluso 5-6 veces superiores a las de la EntP producida por *E. faecium* P13. Igualmente, conviene destacar que la producción de EntP por las cepas recombinantes de *L. lactis* fue, en la mayoría de los casos, superior a la observada con otras bacteriocinas producidas por otras BAL utilizando el sistema dedicado DTS (Chikindas y col., 1995; van Belkum y col., 1997; Axelsson y col., 1998b; Biet y col., 1998; Horn y col., 1998, 1999; Horn y col., 2004; Arqués y col., 2008) o la ruta general de secreción (GSP) o sistema Sec-dependiente (Worobo y col., 1995; Biet y col., 1998; McCormick y col., 1999; Moon y col., 2005), lo que sugiere que el PS<sub>entP</sub> dirige eficazmente el procesamiento y secreción

de esta bacteriocina en *L. lactis* y, por ello, podría utilizarse como péptido de secreción (PS) que permita el procesamiento, transporte y secreción de otros péptidos o proteínas de interés por *L. lactis* u otras BAL (Gutiérrez y col., 2006).

Para evaluar el potencial del PS<sub>entP</sub> para dirigir la síntesis, procesamiento y secreción de bacteriocinas por otras BAL nuestro grupo investigador también ha realizado estudios donde quimeras génicas del PS<sub>entP</sub> fusionado a la pediocina PA-1 madura (*pedA*), con o sin su gen de inmunidad (*pedB*), se clonaron en el vector de expresión pMG36c. Cuando los plásmidos derivados resultantes se transfirieron a células competentes de *L. lactis* IL1403, *L. lactis* NZ9000, and *L. lactis* DPC5598 las cepas recombinantes resultantes permitieron la producción de PedA-1 y la coproducción de PedA-1 y NisA. Sin embargo, la producción de PedA-1 fue más pequeña (47-55%) y su actividad antimicrobiana específica menor (12-44%), que la producción y actividad antimicrobiana específica de la PedA-1 producida por *P. acidilactici* PLBH9 (Martín y col., 2007a). Sin embargo, el desarrollo de experiencias similares con la EntA permitieron una mayor producción de EntA en los sobrenadantes de las cepas productoras de *L. lactis*, aunque su actividad antimicrobiana y actividad antimicrobiana específica fueron menores que las deducidas de su producción (Martín y col., 2007b). Es posible que la secuencia aminoacídica de la región N-terminal de la PedA-1 madura afecte su translocación a través de la membrana citoplasmática de *L. lactis*, ya que se ha observado que la presencia de aminoácidos básicos en esta región reduce la secreción de proteínas mientras la presencia de aminoácidos ácidos o neutros, la favorece (Le Loir y col., 2001). No obstante, otros factores que pueden modificar la producción y actividad antimicrobiana de bacteriocinas producidas por BAL u otros hospedadores microbianos se encuentran reflejados en la **Tabla 2.3**.

Otro de los péptidos señal (PS) evaluados para la secreción heteróloga de péptidos y proteínas es el de la proteína Usp45 (PS<sub>usp45</sub>), la proteína mayoritaria secretada por *L. lactis*, que se ha empleado para dirigir la producción heteróloga de péptidos y proteínas por *L. lactis* (van Asseldonk y col., 1990; Mierau y Kleerebezem, 2005; Kuipers y col., 2006; Morello y col., 2008; Borrero y col., 2011a,b). El uso de vectores de expresión proteica con el PS<sub>usp45</sub> fusionado a la NisA madura y su transferencia a células competentes de *L. lactis* ha permitido la producción de NisA biológicamente activa y la de otros péptidos derivados de la NisA (Kuipers y col., 2006). La fusión del PS<sub>usp45</sub> con la secuencia nucleotídica sintética de la DvnR41 (*dvnRV41*), producida por *Cb. divergens* V41 y con el codon de uso (del inglés, *codon usage*) de *E. coli*, bajo el control del promotor de la NisA (P<sub>nisA</sub>) en el vector de expresión pSEC-ET ha originado el plásmido recombinante pSEC:*DvnRV41*. La inducción de cepas de *L. lactis* NZ9000 (pSEC:*DvnRV41*) con NisA ha permitido la producción y secreción de DvnRV41 por la cepa hospedadora. Sin embargo, aunque la producción de DvnRV41 por *L. lactis* NZ9000 (pSEC:*DvnRV41*) es similar a la de *Cb. divergens* V41, su actividad antimicrobiana y actividad antimicrobiana específica es mucho menor que la deducida de su producción (Bermudez-Humarán y col., 2007). Ya que la actividad antimicrobiana de la DvnRV41 producida no se ha afectado por la actividad de las proteasas endocelulares ClpP y HtrA de *L. lactis* NZ9000, posiblemente, alguno de los factores descritos en la **Tabla 2.3**, podrían explicar las diferencias detectadas en la actividad

antimicrobiana de la DvnRV41 natural y la recombinante producida por *L. lactis* NZ9000 (pSEC:DvnRV41) (Bermúdez-Humarán y col., 2007).

**Tabla 2.3.** Factores que pueden modificar la producción y actividad antimicrobiana de bacteriocinas producidas por BAL u otros hospedadores microbianos.

- Regulación de su producción, por la respuesta al estrés derivada de una elevada producción de bacteriocinas
- Diferencias en los componentes del sistema DTS y GPS o Sec-dependiente
- Características de la secuencia líder (SL) y del péptido señal (PS)
- Características fisicoquímicas y bioquímicas de la bacteriocina madura
- Reconocimiento del péptido señal (PS) por las peptidasas señal
- Plegamiento de las proteínas y péptidos secretados por las chaperonas y proteasas encargadas del control de su plegamiento
- Género, especie y características fisiológicas del hospedador microbiano
- Número de copias del vector de expresión proteica
- Características del promotor que dirige la expresión génica
- Nivel de transcripción de los sistemas reguladores de dos y tres componentes
- Diferencias en el codón de uso, estabilidad y eficiencia de traducción del ARN mensajero
- Correcta o incorrecta formación de enlaces disulfuro
- Eficiencia de los procesos posttraduccionales de conversión de la prebacteriocina a la bacteriocina madura
- Plegamiento intramolecular de la bacteriocina para mantener la prebacteriocina inactiva durante su secreción.
- Modificaciones químicas de los aminoácidos de su estructura primaria
- Oxidación de las bacteriocinas
- Modificaciones conformacionales que originan formas menos activas de la bacteriocina
- Diferencias en el plegamiento, estructura secundaria y estructura terciaria de las bacteriocinas
- Producción variable de las bacteriocinas en cepas productoras multibacteriocinogénicas
- Agregación de las bacteriocinas entre sí y/o con componentes del medio de cultivo
- Degradación de las bacteriocinas por proteasas intracelulares y/o extracelulares del hospedador
- Adsorción de las bacteriocinas en la membrana citoplasmática
- Interacción inadecuada de las bacteriocinas con la membrana celular del microorganismo productor
- Adsorción de las bacteriocinas a las células productoras o a componentes del medio de cultivo

Fuente: Borrero (2011).

Por ello, de gran interés científico y aplicado sigue siendo la búsqueda y evaluación de péptidos señal (PS) que permitan la producción heteróloga de proteínas y péptidos en *L. lactis* y otras BAL, de manera más eficaz en cuanto a una mayor producción de la proteína o péptido de interés así como de la producción de proteínas y péptidos de mayor actividad biológica (Ravn y col., 2003; Brockmeier y col., 2006; Mathiesen y col., 2008, 2009; Morello y col., 2008; Borrero y col., 2011b).

### 2.3.2. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE BACTERIOCINAS POR LEVADURAS

Las levaduras combinan la facilidad de su manipulación genética y las características de crecimiento de las procariotas con los mecanismos de modificación postraduccionales de las eucariotas. Igualmente, muchas de ellas se han utilizado como hospedadores heterólogos para la producción de una gran variedad de proteínas y péptidos de procariotas y eucariotas debido a sus elevados niveles de expresión génica y a que, en muchos casos, poseen promotores potentes y fuertemente regulados (Weinacker y col., 2013). Por ello, se piensa que las levaduras pueden constituir una alternativa interesante a las BAL para la producción heteróloga de bacteriocinas.

La primera levadura evaluada como sistema de producción heteróloga de proteínas y péptidos fue *Saccharomyces cerevisiae*. Como en el caso de *E. coli*, *S. cerevisiae* es uno de los organismos mejor caracterizados genética y fisiológicamente y, además, su consideración de microorganismo seguro y su empleo habitual en la industria alimentaria en la elaboración de una gran variedad de alimentos como la cerveza, vino, sidra y otras bebidas alcohólicas y productos de panadería, favorece su elección para la producción recombinante de bacteriocinas. Sin embargo, la utilización de *S. cerevisiae* no siempre se considera ideal para la producción de proteínas y péptidos recombinantes ya que posee inconvenientes como: (a) su bajo nivel de producción; (b) la inestabilidad de las cepas recombinantes; (c) su alto grado de glucosilación; y (d) su difícil adaptación a ensayos de tipo industrial (Gellissen y col., 2005). Por ello, ya se han realizado estudios que permiten la producción heteróloga de proteínas y péptidos de interés por otras levaduras como las metilotrofas *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*) y *Kluyveromyces lactis* o las dimórficas *Arxula adeninivorans* y *Yarrowia lipolytica* (Gellissen y col., 2005; Böer y col., 2007a).

De entre las levaduras metilotrofas *P. pastoris* es la más utilizada como modelo de producción heteróloga de péptidos y proteínas. Esta levadura se considera de interés por su facilidad de manipulación genética, de transformación, de clonación por complementación, de producir elevados niveles de proteínas intracelulares y extracelulares, y por su capacidad de realizar modificaciones postraduccionales de los péptidos y proteínas producidos como la formación de enlaces disulfuro, glucosilación y procesamiento proteolítico. Además, la utilización de vectores de expresión de integración en el genoma facilita la estabilidad de los insertos en procesos de fermentación continuos y escalados. La utilización de *P. pastoris* como hospedador heterólogo permite obtener buenos resultados de producción de proteínas recombinantes y facilita el escalado de los ensayos de laboratorio a situaciones de tipo industrial (Weinacker y col., 2013; Ahmad y col., 2014). Además, la actividad biológica de los productos recombinantes secretados se facilita por los bajos niveles de producción de proteasas nativas (Cereghino y col., 2002; Daly y Hearn, 2005; Macauley-Patrick y col., 2005).

Otra levadura que ha dado buenos resultados a nivel industrial es *Kluyveromyces lactis*, siendo una de las primeras levaduras en las que se estableció un sistema de transformación

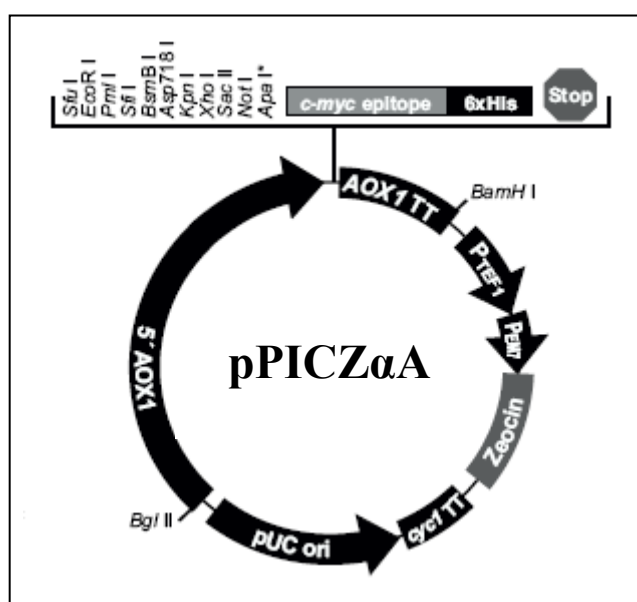
eficaz (Das y Hollenberg, 1982). A nivel de factoría celular, *K. lactis* es conocida por la producción industrial de la quimosina bovina, enzima utilizada en la industria lechera para coagular la leche en la producción del queso (Van den Berg y col., 1990), siendo ésta la primera enzima producida a bajo coste por un hospedador eucariota. A día de hoy más de 40 proteínas de bacterias, hongos, virus, plantas y mamíferos han sido producidas de manera eficaz por dicha levadura, lo que la convierte en una productora muy eficiente de proteínas. Como hospedador, *K. lactis* es de fácil manipulación genética, permite el uso de vectores integrativos y episomales y se conoce la secuencia completa de su genoma (Dujon y col., 2004). Además, se desarrolla en medios de cultivo estándar de levaduras y es una levadura considerada GRAS (de inglés, *Generally Recognized As Safe*) (van Ooyen y col., 2006).

Sin embargo, además de la utilización de *S. cerevisiae*, *P. pastoris* y *K. lactis* como hospedadores heterólogos para la producción de proteínas y péptidos de interés biotecnológico, conviene el desarrollo y evaluación de vectores de expresión proteica activos y eficaces no solamente en las levaduras citadas, sino en otras más (Idiris y col., 2010; Ahmad y col., 2014). El diseño y desarrollo de vectores expresión activos en un amplio número de levaduras, como el vector CoMed<sup>TM</sup> puede facilitar la producción heteróloga de proteínas por diversas levaduras y, por ello, permitir un análisis más rápido de las levaduras más eficaces para la producción heteróloga de una determinada proteína o péptido de interés (Gellisen y col., 2005; Steinborn y col., 2006). Por ello, levaduras eficazmente transformadas con este vector como *Hansenula polymorpha*, *Arxula adeninivorans* y *Yarrowia lipolytica* manifiestan un prometedor potencial biotecnológico como productoras de proteínas y péptidos codificados por el vector CoMed<sup>TM</sup> (Gellisen y col., 2005; Böer y col., 2007b).

Por lo que respecta a la producción heteróloga de bacteriocinas por levaduras, Schoeman y col., (1999) fueron los primeros en describir la producción heteróloga de la PedA-1 en *S. cerevisiae*. Para ello, dichos investigadores utilizaron un vector de expresión proteica con el péptido señal (PS) del factor alfa (MF $\alpha$ 1s, del inglés *Mating Pheromone  $\alpha$ -factor 1 secretion signal*), una feromona que se sintetiza como una preproteína bajo el control del promotor del gen de la alcohol deshidrogenasa, fusionado a la PedA-1 madura. La transformación de *S. cerevisiae* con el plásmido recombinante se tradujo en la producción de PedA-1 biológicamente activa, pero con diferencias en la actividad antimicrobiana de la PedA-1 dependiendo del desarrollo de la levadura productora en medio sólido o líquido, con una actividad antimicrobiana prácticamente indetectable en medio líquido. Esto se atribuyó a que la bacteriocina sintetizada se mantenía asociada a la membrana y/o la pared celular de las levaduras productoras. Sin embargo, la ausencia de técnicas analíticas fiables de detección y cuantificación de la PedA-1 producida no permitió determinar la relación entre la bacteriocina producida y su actividad biológica, probablemente disminuida por una posible glucosilación de su molécula, por la actividad de enzimas proteolíticos, por agregación entre sí o a otras moléculas o por causas bioquímicas o biofísicas todavía desconocidas.

Posteriormente, van Reenen y col., (2003) describieron la clonación y producción de la Pln423 de *Lb. plantarum* 423 en *S. cerevisiae*, con las mismas limitaciones respecto a la actividad antimicrobiana de la Pln423 en los sobrenadantes de las cepas recombinantes de *S.*

*cerevisae* que las encontradas respecto a la producción y actividad antimicrobiana de la PedA-1 producida por *S. cerevisiae* (Schoeman y col., 1999). El gen estructural de la *pedA* también se ha expresado en la levadura *P. pastoris* KM71H (MutS) utilizando el vector de expresión pPICZαA (Beaulieu y col., 2005) (**Fig. 2.10.**) Aunque el uso de anticuerpos policlonales anti-PedA-1 (cedidos por nuestro grupo investigador al grupo previamente citado) permitieron la detección y cuantificación inmunoquímica de la PedA-1 en los sobrenadantes de los cultivos de *P. pastoris* recombinantes, la PedA-1 producida no mostró actividad antimicrobiana debido a una intensa asociación, probablemente mediante enlaces covalentes, de un material similar al colágeno a la PedA-1 recombinante.



**Figura 2.10.** Vector de expresión proteica pPICZαA

Sin embargo, experiencias realizadas por nuestro grupo investigador han permitido la producción y expresión funcional de diversas bacteriocinas por levaduras. La clonación del gen de la EntP madura (*entP*) en el vector de expresión pPICZαA y su posterior transferencia a células competentes de *P. pastoris* X-33, permitieron una elevada producción de la EntP biológicamente activa en los sobrenadantes de las levaduras recombinantes. La producción de EntP por la cepa de *P. pastoris* X-33tl desarrollada en un medio de cultivo complejo fue 3,7 veces mayor que la producción de dicha bacteriocina por *E. faecium* P13, mientras su actividad antimicrobiana y actividad antimicrobiana específica fueron 16 y 4,3 veces mayores, respectivamente, que la de la EntP producida por *E. faecium* P13 (Gutiérrez y col., 2005c). La clonación de la bacteriocina HirJM79, producida por *E. hirae* DCH5, en el vector de expresión pPICZαA transferido a *P. pastoris* X-33TH también ha facilitado la producción y expresión funcional de la HirJM79 por dicho hospedador. Sin embargo, aunque la producción de HirJM79 por *P. pastoris* X-33TH fue superior a la producción de la misma bacteriocina por *E. hirae* DCH5, su actividad antimicrobiana y actividad antimicrobiana específica fueron menores de la deducida de su producción (Sánchez y col., 2008).

La clonación de la EntL50 (EntL50A y EntL50B) en vectores de expresión proteica apropiados también ha permitido la producción y expresión funcional de la EntL50A, EntL50B y de ambas por células recombinantes de *S. cerevisiae* (Basanta y col., 2009; Basanta y col., 2010). Para ello, primero se hizo necesario construir un vector de expresión y secreción estable para *S. cerevisiae*, denominado pYABD01, por medio de la clonación del PS del factor MF $\alpha$ 1s en el vector de expresión de *S. cerevisiae*, denominado pYES2. Posteriormente, los genes estructurales de la EntL50A y EntL50B (*entL50A* y *entL50B*) se clonaron juntos o separados en dicho vector bajo el control del promotor del operon Gal1 (P<sub>gal1</sub>), inducible por galactosa y represible por glucosa, y los vectores derivados resultantes se transfirieron a células competentes de *S. cerevisiae*. Los genes estructurales de la EntL50A y EntL50B se clonaron también en el vector pPICZ $\alpha$ A para su expresión por *P. pastoris*. De esta manera, se obtuvieron levaduras recombinantes de *S. cerevisiae* y *P. pastoris*, productoras de las bacteriocinas EntL50A y EntL50B con actividad biológica. No obstante, convendría optimizar la producción de ambas bacteriocinas por *S. cerevisiae* y *P. pastoris* ya que su producción y actividad antimicrobiana fueron inferiores a las observadas con otras bacteriocinas previamente evaluadas (Basanta y col., 2010).

Por último, recientemente se ha procedido a la clonación, producción y expresión funcional de la bacteriocina EntA por las levaduras *P. pastoris* X-33EA, *K. lactis* GG799EA, *H. polymorpha* KL18-1EA y *A. adenivorans* G1212EA transformadas, respectivamente, con los vectores de expresión proteica pPICEA, pKLEA, pBTEA y pBYEA (Borrero y col., 2012). De gran interés, es el notable incremento (20-30 veces) de la producción de EntA por *P. pastoris* X-33EA y, sobre todo, la elevada actividad antimicrobiana (255-430 veces) y elevada actividad antimicrobiana específica (11-14 veces) de la EntA producida por *P. pastoris* X-33EA respecto a la producida por el productor natural *E. faecium* T136. Más aún, una vez purificada a homogeneidad la EntA exhibe una actividad antimicrobiana y una actividad antimicrobiana específica frente a numerosas especies de *Listeria*, mucho mayor que la deducida de su concentración y de su comparación con la EntA purificada producida por *E. faecium* T136 (Borrero y col., 2012).

# CAPÍTULO / CHAPTER 3

**Clonación, producción y expresión funcional de la bacteriocina sakacina A (SakA) y de dos de sus quimeras derivadas de la SakA por bacterias lácticas (BAL) y las levaduras *Pichia pastoris* y *Kluyveromyces lactis***

---

**Cloning, production and functional expression of the bacteriocin sakacin A (SakA) and two SakA derived chimeras in lactic acid bacteria (LAB) and the yeasts *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis***





## ABSTRACT

Mature sakacin A (SakA, encoded by *sapA*) and its cognate immunity protein (SakI, encoded by *sapiA*), and two SakA-derived chimeras mimicking the N-terminal end of mature enterocin P (EntP/SakA) and mature enterocin A (EntA/SakA) together with SakI, were fused to different signal peptides (SP) and cloned into the protein expression vectors pNZ8048 and pMG36c for evaluation of their production and functional expression by different lactic acid bacteria (LAB). The amount, antimicrobial activity, and specific antimicrobial activity of the SakA and its chimeras produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 depended on the SP and the expression vector. Only *L. lactis* NZ9000 (pNUPS), producing EntP/SakA, showed higher bacteriocin production and antimicrobial activity than the natural SakA-producer *Lactobacillus sakei* Lb706. The lower antimicrobial activity of the SakA-producer *L. lactis* NZ9000 (pNUS) and that of the EntA/SakA-producer *L. lactis* NZ9000 (pNUAS) could be ascribed to secretion of truncated bacteriocins. On the other hand, of the *Lb. sakei* Lb706 cultures transformed with the pMG36c-derived vectors only *Lb. sakei* Lb706 (pGUS) overproducing SakA showed a higher antimicrobial activity than *Lb. sakei* Lb706. Finally, cloning of SakA and EntP/SakA into pPICZ $\alpha$ A and pKLAC2 permitted the production of SakA and EntP/SakA by recombinant *Pichia pastoris* X-33 and *Kluyveromyces lactis* GG799 derivatives although their antimicrobial activity was lower than expected from their production.

**Keywords:** Bacteriocins; Sakacin A; Sakacin A-derived chimeras; Lactic acid bacteria (LAB); *Pichia pastoris*; *Kluyveromyces lactis*; Heterologous bacteriocin production



### 3.1. INTRODUCTION

Lactic acid bacteria (LAB) secrete small, cationic, heat-stable, antimicrobial peptides, commonly known as bacteriocins and many are more active than conventional antibiotics against pathogenic and drug-resistant Gram-positive bacteria, yet display no toxicity towards eukaryotic cells (Cotter et al., 2005; Kjos et al., 2011). Accordingly, bacteriocins produced by LAB may find their use as natural antimicrobial peptides in food, medical, veterinary, and animal production applications whereas bacteriocin-producing LAB could be evaluated for their potential use as probiotics (Borrero et al., 2011a; Borrero et al., 2011b; Montalbán-López et al., 2011; Dobson et al., 2012). However, the low bacteriocin yields obtained after their purification from natural producers and the high cost of synthetic bacteriocin synthesis, drive the exploration recombinant microbial systems for the biotechnological production of bacteriocins.

Bacteriocins produced by LAB may be classified into the class I lantibiotics, containing post-translationally modified amino acids, and the class II nonlantibiotics, containing non-modified amino acids. Class II bacteriocins may be further subdivided into the (i) pediocin-like (class IIa) bacteriocins, (ii) two-peptide (class IIb) bacteriocins, (iii) cyclic (class IIc) bacteriocins, and (iv) nonpediocin one-peptide linear (class IId) bacteriocins (Cotter et al., 2005; Nes et al., 2007). All pediocin-like bacteriocins have similar amino acid sequences, especially in their rather hydrophilic N-terminal half, which contains a disulfide bridge and a common YGNGVxC “pediocin box” motif, followed by a hinge and a somewhat more hydrophobic and diverse C-terminal half (Haugen et al., 2011). The target receptor for class IIa bacteriocins on sensitive cells has been identified as proteins of the sugar transporter mannose phosphotransferase system (Man-PTS) (Diep et al., 2007). It has been suggested that the conserved N-terminal half of these bacteriocins initially interact with the receptor to enable the C-terminal half to engage in more profound and active interactions with the receptor rendering the permeases open as pores, thereby causing leakage of solutes, disruption of membrane integrity, and eventually cell death (Kjos et al., 2011).

Most class IIa bacteriocins are synthesized as biologically inactive precursors or prepeptides containing an N-terminal extension of the so-called double-glycine type (leader sequence) that is cleaved concomitantly with export across the cytoplasmic membrane by dedicated ATP-binding cassette transporters (ABC-transporters) and their accessory proteins (Håvarstein et al., 1995). However, many secreted prokaryotic proteins and a few bacteriocins such as enterocin P [14] and hiracin JM79 [44] contain N-terminal extensions of the so-called Sec-type (signal peptide) which are proteolytically cleaved concomitantly with peptide externalization by the general secretory pathway (GSP) or Sec-dependent pathway. Secretory proteins are equipped with an N-terminal signal peptide (SP) that functions as a target and recognition signal for signal peptidases that remove the SP from the translocated protein, resulting in the extracellular release of the mature protein or peptide (Driessen and Nouwen, 2007; Natale et al., 2008). Accordingly, the SP of secretory proteins may drive the access of fused mature proteins or peptides to the GSP for their secretion by the heterologous producer cells.

Sakacin A (SakA) is a class IIa, pediocin-like, antilisterial bacteriocin produced by *Lb. sakei* Lb706 (Holck et al., 1992). The *sap* locus responsible for SakA production in *Lb. sakei* Lb706 is located in a 60-kb pLSA60 plasmid harbouring the *sapAIPhKRTE* operon. The genes *sapA* and *saiA* encode the 59 amino acid SakA precursor, consisting of a 18 amino-acid leader sequence (LS<sub>sapA</sub>) and the 41 amino acid mature bacteriocin (SakA), and the 90 amino acid immunity protein (SakI), respectively. The synthesis of SakA in *Lb. sakei* Lb706 is a temperature-sensitive process regulated by the peptide pheromone through a three-component regulatory system. In this respect, *sap-Ph*, *sapK* and *sapR* encode the pheromone induction factor, the histidine protein kinase and the response regulator, respectively. Finally, the *sapT* and *sapE* encode an ABC-transporter and its cognate accessory protein (Diep et al., 2000).

The production of SakA and immunity to the bacteriocin has been obtained in the recombinant non-bacteriocin-producing host *Lb. sakei* Lb790 but not in other LAB, probably because signal-transducing systems were not functioning properly (Axelson and Holck, 1995). Accordingly, as a further attempt to improve the production and functional expression of this tightly regulated bacteriocin by other microbial hosts we have evaluated the fusion of mature sakacin A (SakA, encoded by *sapA*) and its cognate immunity protein (SakI, encoded by *saiA*), and of two SakA derived chimeras mimicking the N-terminal end of mature enterocin P (EntP/SakA) and mature enterocin A (EntA/SakA) to different signal peptides and their expression by *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 and *Lb. sakei* Lb706. Moreover, the cloning of SakA and the EntP/SakA-derived chimera in different yeast protein expression vectors has also permitted the evaluation of their functional expression by the yeasts *Pichia pastoris* X-33 and *Kluyveromyces lactis* GG799.

## 3.2. MATERIALS AND METHODS

**3.2.1. Microbial strains, plasmids, and growth conditions.** The microbial strains and plasmids used in this study are listed in **Table 3.1**. *Lactobacillus sakei* Lb706 was used as the source of *sapA* (SakA) and *saiA* (SakI), whereas *Lactococcus lactis* MG1363, *Enterococcus faecium* P13, and *E. hirae* DCH5 were used as the source of the signal peptides Usp45 (SP<sub>usp45</sub>), EntP (SP<sub>entP</sub>), and HirJM79 (SP<sub>hirJM79</sub>), respectively. The primary amino acid and nucleotide sequence of the SP<sub>usp45</sub>, SP<sub>entP</sub>, and SP<sub>hirJM79</sub> are given by the GenBank accession numbers M60178, AF005278 and DQ664500, respectively. The GenBank accession number for the structural sakacin A (*sapA*) and immunity (*saiA*) genes of *Lb. sakei* Lb706 is Z46867. The lactococcal strains were propagated at 32°C in M17 broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) supplemented with 0.5% (w/v) glucose (GM17). The enterococcal strains and the lactobacilli were grown in MRS broth (Oxoid) at 32°C. *Pichia pastoris* X-33 (Invitrogen Life Technologies, Barcelona, Spain) and *Kluyveromyces lactis* GG799 (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) were cultured in YPD medium (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) at 30°C with shaking. *Escherichia coli* JM109 (Invitrogen) was grown in LB broth (Sigma) at 37°C with shaking. *Listeria* spp. strains were cultured in BHI broth (Oxoid) at 32°C. Agar plates were made by addition of 1.5% (w/v) agar (Oxoid) to the liquid media. When necessary, chloramphenicol (Sigma), zeocin (Invitrogen) and ampicillin (Sigma) were

used at a concentration of 5, 25 and 50 µg/ml, respectively. Cell dry weights of late exponential phase bacterial cultures, expressed as cell dry mass, were determined gravimetrically.

**3.2.2. Basic genetic techniques and enzymes.** Total genomic DNA from *Lb. sakei* Lb706, *L. lactis* MG1363, *E. faecium* P13, and *E. hirae* DCH5 was isolated using the Wizard<sup>®</sup> DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). Plasmid DNA isolation was carried out using the QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), as suggested by the manufacturer, but cells were suspended with lysozyme (40 mg ml<sup>-1</sup>) and mutanolysin (500 U ml<sup>-1</sup>) and incubated at 37°C for 10 min to weaken the cell wall before following the kit instructions. DNA restriction enzymes were supplied by New England Biolabs. Ligations were performed with the T4 DNA ligase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). *E. coli* JM109 and *K. lactis* GG799 competent cells were transformed as described by the supplier (Invitrogen and New England Biolabs, respectively). Competent *P. pastoris* X-33 cells were obtained as recommended by the supplier (Invitrogen) and transformed by electroporation with a Gene Pulser<sup>™</sup> and Pulse Controller apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), as previously described [29].

**3.2.3. PCR amplification and nucleotide sequencing.** Oligonucleotide primers were purchased from Sigma-Genosys Ltd. (Cambridge, UK). Conditions for PCR-amplifications were performed as previously described [8]. The PCR-generated fragments were purified by a NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany) for cloning and nucleotide sequencing. Nucleotide sequencing of purified PCR products was done using the ABI PRISM<sup>®</sup> BigDye<sup>™</sup> Terminator cycle sequence reaction kit and the automatic DNA sequencer ABI PRISM, model 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), at the Unidad de Genómica (Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, Spain).

**Table 3.1.** Microbial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Description <sup>a</sup>	Source and/or reference <sup>b</sup>
<b>Strains</b>		
<i>E. coli</i> JM109	Selection of recombinant plasmids	Invitrogen Life Technologies
<i>E. faecium</i>		
T136	Enterocin A and B producer; MPA indicator	DNBTA, Casaus et al. (1997)
P13	Enterocin P producer	DNBTA, Cintas et al. (1997)
<i>E. hirae</i>		
DCH5	Hiracin JM79 producer	DNBTA, Sánchez et al. (2007)
<i>Lb. sakei</i>		
Lb706	Sakacin A producer	LMG, Axelsson and Holck (1995)
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>		
BB24	Nisin A producer	DNBTA, Cintas (1995)
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>		
NZ9000	MG1363 pepN:: <i>nisRK</i>	NIZO, Kuipers et al. (1998)
MG1363	Plasmid-free derivative of NCDO712; source of <i>usp45</i>	IFR, Gasson (1983)
<i>P. pastoris</i> X-33	Yeast laboratory strain	Invitrogen Life Technologies
<i>K. lactis</i> GG799	Yeast laboratory strain	New England Biolabs
<b>Plasmids</b>		
pMG36c	Cm <sup>r</sup> , pMG36e derivative	RUG-MG, van de Guchte et al. (1989)
pNZ8048	Cm <sup>r</sup> ; inducible expression vector carrying the <i>nisA</i> promoter	NIZO, Kuipers et al. (1998)
pPICZaA	Zeo <sup>r</sup> ; integrative plasmid carrying the secretion signal sequence from the <i>S. cerevisiae</i> $\alpha$ -factor prepropeptide and functional sites for the integration at the 5'AOX1 locus of <i>P. pastoris</i> X-33	Invitrogen Life Technologies
pKLAC2	Amp <sup>r</sup> ; integrative plasmid carrying the <i>Aspergillus nidulans</i> acetamidase ( <i>amdS</i> ) gene, the secretion signal sequence from the <i>S. cerevisiae</i> $\alpha$ -factor prepropeptide and functional sites for the integration at the LAC4 locus of <i>K. lactis</i> GG799	New England Biolabs
pNUS	Cm <sup>r</sup> ; pNZ8048 derivative carrying the PCR product NUS (SP <sub>usp45</sub> fused to mature <i>sapA</i> and <i>saiA</i> genes)	This work
pNPS	Cm <sup>r</sup> ; pNZ8048 derivative carrying the PCR product NPS (SP <sub>entP</sub> fused to mature <i>sapA</i> and <i>saiA</i> genes)	This work
pNHS	Cm <sup>r</sup> ; pNZ8048 derivative carrying the PCR product NHS (SP <sub>hirJM79</sub> fused to mature <i>sapA</i> and <i>saiA</i> genes)	This work
pNUAS	Cm <sup>r</sup> ; pNZ8048 derivative carrying the PCR product NUAS (SP <sub>usp45</sub> fused to mature <i>entA/sapA</i> and <i>saiA</i> genes)	This work
pNUPS	Cm <sup>r</sup> ; pNZ8048 derivative carrying the PCR product NUPS (SP <sub>usp45</sub> fused to mature <i>entP/sapA</i> and <i>saiA</i> genes)	This work

pGUS	Cm <sup>r</sup> ; pMG36c derivative carrying the PCR product GUS (P <sub>32</sub> ribosome binding site and the SP <sub>usp45</sub> fused to mature <i>sapA</i> and <i>saiA</i> genes)	This work
pGUAS	Cm <sup>r</sup> ; pMG36c derivative carrying the PCR product GUAS (P <sub>32</sub> ribosome binding site and the SP <sub>usp45</sub> fused to mature <i>entA/sapA</i> and <i>saiA</i> genes)	This work
pGUPS	Cm <sup>r</sup> ; pMG36c derivative carrying the PCR product GUPS (P <sub>32</sub> ribosome binding site and the SP <sub>usp45</sub> fused to mature <i>entP/sapA</i> and <i>saiA</i> genes)	This work
pPSA	pPICZaA derivative carrying the PCR product KR-SA	This work
pPPSA	pPICZaA derivative carrying the PCR product KR-PSA	This work
pKSA	pKLAC2 derivative carrying the PCR product KR-SA	This work
pKPSA	pKLAC2 derivative carrying the PCR product KR-PSA	This work

<sup>a</sup>MPA, microtitre plate assay; Cm<sup>r</sup>, chloramphenicol resistance; Zeo<sup>r</sup>, zeocin resistance; Amp<sup>r</sup>, ampicillin resistance

<sup>b</sup>DNBTA, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid (Madrid, Spain); LMG, Laboratory of Microbial Gene Technology, Department of Chemistry, Biotechnology and Food Science, Norwegian University of Life Sciences (Ås, Norway); NIZO, Department of Biophysical Chemistry, NIZO Food Research (Ede, The Netherlands); IFR, Institute of Food Research (Norwich, United Kingdom); RUG-MG, Department of Molecular Genetics, University of Groningen (Haren, The Netherlands)



**3.2.4. Recombinant plasmids derived from pNZ8048.** The primers and inserts used for the construction of the recombinant plasmids are listed in **Table 3.2**. Plasmid derivatives were constructed as follows: the primer pairs USPBS-F/USPSKA-R, EPBS-F/EPISA-R and HNZ-F/SAPSH-R were used for PCR-amplification from total genomic DNA of *L. lactis* MG1363, *E. faecium* P13, and *E. hirae* DCH5 of the NU, NP and NH fragments encoding the SP<sub>usp45</sub>, SP<sub>entP</sub>, and SP<sub>hirJM79</sub>, respectively, with a tail complementary to the N-terminal sequence of SakA. Primers USPBS-F/USEA-R were used for PCR-amplification from total genomic DNA of *L. lactis* MG1363 of a 137-bp *Bsp*HI fragment (NUA) containing the SP<sub>usp45</sub> and the N-terminal nucleotide sequence ACCACTCATAGTGGTAAATAT::*sapA* mature (*entA/sapA*), encoding the first 7 amino acids (TTHSGKY) from EntA fused to mature *sapA*. Primers USPBS-F/USEP-R were used for PCR-amplification from *L. lactis* MG1363 of a 117-bp *Bsp*HI fragment (NUP) containing the SP<sub>usp45</sub> and the N-terminal nucleotide sequence of the GCTACG::*sapA* mature (*entP/sapA*) encoding the first 2 amino acids (AT) from EntP fused to mature *sapA*. Primers SKA-F/SKAJEI-R were used for PCR-amplification from total genomic DNA of *Lb. sakei* Lb706 of a 428-bp *Hind*III fragment (A) containing mature *sapA* and *saiA*. Primers SEA-F/SKAJEI-R were used for PCR-amplification from *Lb. sakei* Lb706 of a 440-bp *Hind*III fragment (B) containing the *entA/sapA* chimera and *saiA*. Primers SEP-F/SKAJEI-R were used for PCR-amplification from *Lb. sakei* Lb706 of a 431-bp *Hind*III fragment (C) containing the *entP/sapA* chimera and *saiA*. Mixtures of fragments NU and A, of fragments NP and A, and of fragments NH and A were used as templates to amplify the PCR products NUS, NPS, and NHS encoding mature *sapA* fused to the SP<sub>usp45</sub>, SP<sub>entP</sub> and SP<sub>hirJM79</sub>, respectively, and *saiA*. Similarly, mixtures of fragments NUA and B, and NUP and C were used as templates to amplify the 532-bp *Bsp*HI-*Hind*III fragment NUAS, and the 523-pb *Bsp*HI-*Hind*III fragment NUPS, encoding the EntA/SakA and the EntP/SakA chimeras, respectively, fused to the SP<sub>usp45</sub>, and SakI. Fragments NUS, NPS, NHS, NUAS and NUPS were digested with the corresponding restriction enzymes and inserted into pNZ8048, with transcription of the cloned bacteriocins under control of the inducible P<sub>nisA</sub> promoter, which was also digested with *Nco*I/*Hind*III. The ligation mixtures were used to transform *L. lactis* NZ9000 competent cells. The resulting plasmid derivatives pNUS, pNPS, pNHS, pNUAS and pNUPS, respectively, were confirmed by bacteriocinogenicity tests, PCR and sequencing of the inserts.

**3.2.5. Recombinant plasmids derived from pMG36c.** To construct recombinant plasmids derived from pMG36c the purified pNUS, pNUAS and pNUPS plasmids were used as templates by using the primer pair USP-F/SKAJEI-R for generation of *Sac*I-*Hind*III 538-bp (GUS), 550-bp (GUAS) and 541-bp (GUPS) fragments, respectively, containing the P<sub>32</sub> promoter and ribosome binding site (RBS) of pMG36c fused in frame with the genes of interest. The purified inserts were digested with the corresponding restriction enzymes and inserted into plasmid pMG36c digested with the same enzymes. The ligation mixtures were used to transform *L. lactis* NZ9000 and *Lb. sakei* Lb706 competent cells. The plasmid derivatives pGUS, pGUAS and pGUPS, were checked by bacteriocinogenicity tests, PCR and sequencing of the inserts.

**3.2.6. Antimicrobial activity of the recombinant bacterial strains.** The antimicrobial activity of individual LAB colonies was examined by the stab-on-agar test (SOAT), as previously described (Cintas et al., 1997). Recombinant cultures of *L. lactis* NZ9000 were induced for production of SakA or the EntA/SakA and EntP/SakA chimeras when they reached an optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of 0.5, using as inducer crude nisin A (NisA) from the supernatant of *L. lactis* BB24 (NisA producer), at a final concentration of 10 ng ml<sup>-1</sup>. Cell-free culture supernatants from all transformants were obtained by centrifugation of cultures at 12,000 g at 4°C for 10 min, adjusted to pH 6.2 with 1 M NaOH, filtered through 0.2 µm pore-size filters (Whatman Int. Ltd., Maidstone, UK), and stored at -20°C until use. The antimicrobial activity of the supernatants was examined by a microtiter plate assay (MPA) as described (Gutiérrez et al. 2006), using *E. faecium* T136 and *Pediococcus damnosus* CECT4797 as indicator microorganisms. In the MPA, growth inhibition of the sensitive culture was measured spectrophotometrically at 620 nm with a microtitre Labsystems iEMS plate reader (Labsystems, Helsinki, Finland). One bacteriocin unit (BU) was defined as the reciprocal of the highest dilution of the bacteriocin causing 50% growth inhibition (50% of the turbidity of the control culture without bacteriocin). The antimicrobial activity of most recombinant LAB was also tested against *Listeria* spp. obtained from the CECT (Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia, Spain), using the MPA.

**3.2.7. Cloning of the sakacin A structural gene (*sapA*) and its EntP/SakA (GCTACG::*sapA*) chimera in *P. pastoris* X-33 and *K. lactis* GG799, and determination of their antimicrobial activity.** The primers and inserts used for the construction of the recombinant plasmids are listed in Table 3.2. Derivatives of plasmids pPICZαA and pKLAC2 were constructed as follows: primers JJSA-F/JJSA-R and JJPSA-F/JJSA-R were used for PCR amplification from total genomic DNA of *Lb. sakei* Lb706 DNA of the 158-bp and 161-bp *XhoI*-*NotI* fragments KR-SA and KR-PSA, respectively, carrying the α-factor Kex2 signal-protease cleavage site without the Glu-Ala spacer fused to mature SakA and to the EntP/SakA chimera. The KR-SA and KR-PSA fragments were digested with the above mentioned restriction enzymes and the resulting 138-bp and 141-bp fragments were ligated into the pPICZαA and pKLAC2 vectors at appropriate sites to generate plasmids pPSA and pKSA, and pPPSA and pKPSA, respectively. Competent *E. coli* JM109 cells were transformed with these plasmids and the resulting transformants were confirmed by DNA sequencing. Subsequently, *SacI*-linearized pPSA and pPPSA and *SacII*-linearized pKSA and pKPSA were used to transform *P. pastoris* X-33 and *K. lactis* GG799, respectively. The *P. pastoris* X-33SA and *P. pastoris* X-33PSA transformants were selected from YPD agar supplemented with zeocin (100 and 1,000 µg ml<sup>-1</sup>) and sorbitol (1 M). The *K. lactis* GG799SA and *K. lactis* GG799PSA transformants were selected on YCB (New England Biolabs) agar supplemented with Tris-HCl Buffer (30 mM) and acetamide (5 mM). Plates were incubated at 30°C for 3-5 days. The presence of the integrated pPSA, pKSA, pPPSA and pKPSA linearized plasmids in the genome of the transformed yeasts was confirmed by bacteriocinogenicity tests and by PCR and sequencing of the inserts.

**Table 3.2.** Primers, PCR products, and bacteriocins used in this study

Primer or PCR product	Nucleotide sequence (5'-3') or description	Amplification
<b>Primers</b>		
USPBS-F	ATAAACTCATCATGAAAAAAAAAGATTATCTCAGCTATTTTAATGTCTAC	NU, NUA, NUP, NUS, NUAS, NUPS
USP-F	CATAGAGCTCTGTAAGGAGGATTTTTGAAATGAAAAAAAAAGATTATCTCAGCTAT	GUS, GUAS, GUPS
USPSKA-R	GTAAACACCGTTGCCATATGATCTAGCAGCGTAAACACCTGACAACGGG	NU,
EPBS-F	ATAAACTCATCATGAGAAAAAAATTATTTAGTTTAGCTCTTATTGG	NP, NPS
EPSA-R	GTAAACACCGTTGCCATATGATCTAGCTGCATCAACTTTTGTACCAAAAATTTGTC	NP,
HNZ-F	AAACTCATCATGAAAAAGAAAGTATTTAAACATTGTGTTATTCTAGG	NH, NHS
SAPSH-R	GTAAACACCGTTGCCATATGATCTTGCTGCATCAACTTTTATTCCTGTACC	NH,
SKA-F	GCTAGATCATATGGCAACGGTGTTTACTGTAATAAT	A
SKAJEI-R	ATAAGTTAAGCTTGTAATACTAAATCCAGACCACGCCTTAGG	A, B, C, NUS, NPS, NHS, NUAS, NUPS, GUS, GUAS, GUPS
SEP-F	GCTACGAGATCATATGGCAACGGTGTTTAC	C,
USEP-R	CACCGTTGCCATATGATCTCGTAGCAGCGTAAACACCTGACAACGGG	NUP, NUPS
SEA-F	ACCACTCATAGTGGTAAATATTATGGCAACGGTGTTTACTGTAATAAT	B,
USEA-R	GCCATAATATTTACCACTATGAGTGGTAGCGTAAACACCTGACAACGGG	NUA, NUAS
JJSA-F	GAATTCTCGAGAAAAGAGCTAGATCATATGGCAACGGTGTTTAC	KR-SA
JJSA-R	ATAAGTTGGCGGCCGCTATTTACATTTTCAGCTAAACCACTAGCCCAG	KR-SA, KR-PSA
JJPSA-F	GAATTCTCGAGAAAAGAGCTACGAGATCATATGGCAACGGTGTTTAC	KR-PSA
<b>PCR products</b>		
A	428-bp <i>Hind</i> III fragment containing the mature sakacin A ( <i>sapA</i> ) and immunity ( <i>saiA</i> ) genes	
B	440-bp <i>Hind</i> III fragment containing the chimera <i>entA/sapA</i> and <i>saiA</i> genes	
C	431-bp <i>Hind</i> III fragment containing the chimera <i>entP/sapA</i> and <i>saiA</i> genes	
NU	110-bp <i>Bsp</i> HI fragment containing the SP <sub>usp45</sub> and the N-terminal sequence of <i>sapA</i>	
NP	110-bp <i>Bsp</i> HI fragment containing the SP <sub>entP</sub> and the N-terminal sequence of <i>sapA</i>	
NH	129-bp <i>Bsp</i> HI fragment containing the SP <sub>hirJM79</sub> and the N-terminal sequence of <i>sapA</i>	
NUA	137-bp <i>Bsp</i> HI fragment containing the SP <sub>usp45</sub> and the N-terminal sequence of <i>entA/sapA</i>	
NUP	117-bp <i>Bsp</i> HI fragment containing the SP <sub>usp45</sub> and the N-terminal sequence of <i>entP/sapA</i>	
NUS	520-bp <i>Bsp</i> HI/ <i>Hind</i> III fragment containing the SP <sub>usp45</sub> fused to mature <i>sapA</i> and <i>saiA</i> genes	
NPS	520-bp <i>Bsp</i> HI/ <i>Hind</i> III fragment containing the SP <sub>entP</sub> fused to mature <i>sapA</i> and <i>saiA</i> genes	
NHS	526-bp <i>Bsp</i> HI/ <i>Hind</i> III fragment containing the SP <sub>hirJM79</sub> fused to mature <i>sapA</i> and <i>saiA</i> genes	
NUAS	532-bp <i>Bsp</i> HI/ <i>Hind</i> III fragment containing the SP <sub>usp45</sub> fused to <i>entA/sapA</i> and <i>saiA</i> genes	
NUPS	523-bp <i>Bsp</i> HI/ <i>Hind</i> III fragment containing the SP <sub>usp45</sub> fused to <i>entP/sapA</i> and <i>saiA</i> genes	
GUS	538-bp <i>Sac</i> I/ <i>Hind</i> III fragment containing the P <sub>32</sub> ribosome binding site and the SP <sub>usp45</sub> fused to mature <i>sapA</i> and <i>saiA</i> genes	

---

GUAS	550-bp <i>SacI/HindIII</i> fragment containing the P <sub>32</sub> ribosome binding site and the SP <sub>usp45</sub> fused to <i>entA/sapA</i> and <i>saiA</i> genes
GUPS	541-bp <i>SacI/HindIII</i> fragment containing the P <sub>32</sub> ribosome binding site and the SP <sub>usp45</sub> fused to <i>entP/sapA</i> and <i>saiA</i> genes
KR-SA	158-bp <i>XhoI/NotI</i> fragment containing the $\alpha$ -factor Kex2 signal cleavage fused to mature <i>sapA</i>
KR-PSA	161-bp <i>XhoI/NotI</i> fragment containing the $\alpha$ -factor Kex2 signal cleavage fused to mature <i>entP/sapA</i>
Bacteriocins	ARSYGNGVYCNNKKCWVNRGEATQSIIGGMISGWASGLAGM
SakA	ATRSYGNGVYCNNKKCWVNRGEATQSIIGGMISGWASGLAGM
EntP/SakA	TTHSGKYYGNGVYCNNKKCWVNRGEATQSIIGGMISGWASGLAGM
EntA/SakA	

---

The antimicrobial activity of individual *P. pastoris* X33SA, *P. pastoris* X33PSA, *K. lactis* GG799SA, and *K. lactis* GG799PSA transformants was screened by a streak-on-agar test (STOAT). Briefly, the *P. pastoris* X33SA and *P. pastoris* X33PSA transformants were streaked onto BMMY buffered methanol complex medium (1% yeast extract, 2% peptone, 100 mM potassium phosphate [pH 6], 1.34% yeast nitrogen base [YNB] without amino-acids,  $4 \times 10^{-5}$ % biotin and 0.5% methanol) agar and grown at 30°C to induce production of the bacteriocins. During the incubation period, methanol was added daily to the plates at 0.5% (v/v) final concentration to maintain the induction. The *K. lactis* GG799SA and *K. lactis* GG799PSA transformants were streaked onto YPGal (1% yeast extract, 2% peptone and 2% galactose) agar. After incubation of the plates at 30°C for 48 h, 40 ml of MRS soft-agar containing about  $1 \times 10^5$  cfu ml<sup>-1</sup> of the indicator microorganism *P. damnosus* CECT4797 was added, and the plates were further incubated at 30°C overnight for development of inhibition zones.

To determine the growth of the recombinant yeasts and the antimicrobial activity of their supernatants, the *P. pastoris* X33SA and *P. pastoris* X33PSA bacteriocin producers were grown in the buffered glycerol complex medium BMGY (1% yeast extract, 2% peptone, 100 mM potassium phosphate [pH 6], 1.34% YNB without amino-acids,  $4 \times 10^{-5}$ % biotin and 1% glycerol) at 30°C until an optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of approximately 2 to 6 was reached. Cells were then harvested by centrifugation (5,000 x g at 4°C for 10 min), and resuspended to an OD<sub>600</sub> of 1 in BMMY medium. Similarly, the *K. lactis* GG799SA and *K. lactis* GG799PSA cultures were grown in the YPD medium at 30°C until an OD<sub>600</sub> of approximately 2 to 6 was reached. Cells were then harvested by centrifugation (5,000 x g at 4°C for 10 min), washed with YPGal and resuspended to an OD<sub>600</sub> of 1 in fresh YPGal medium. The *P. pastoris* and *K. lactis* cultures were incubated at 30°C for 36 h with shaking (250 rpm). During growth, samples were collected periodically for determination of their OD<sub>600</sub>, bacteriocin production and the antimicrobial activity of their supernatants by the MPA.

**3.2.8. Production of specific anti-SakA polyclonal antibodies and ELISA.** The peptide fragment SAJJ (NH<sub>2</sub>-CSGWASGLAGM-COOH), deduced from the C-terminal amino acid sequence of SakA, was selected as the antigen for the generation of antibodies of predetermined specificity against SakA. The synthetic peptide SAJJ was synthesized by Invitrogen Ltd. (Paisley, Scotland, UK), with a peptide purity of >95%. The peptide SAJJ was conjugated to the keyhole limpet hemocyanin (KLH) carrier protein as a SAJJ-KLH conjugate, 1:2 (w/w), using the components of the inject maleimide-activated mariculture KLH kit (Perbio Science, Rockford, IL, USA) for use as the immunogen. Rabbits (New Zealand White Females) were immunized with SAJJ-KLH, as described previously (Borrero et al. 2011b). Serum was obtained from blood samples incubated overnight at 4°C, centrifuged at 1,000 x g at room temperature for 15 min, and stored at -20°C until use. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) procedures for determination of antiserum specificity and sensitivity were performed as described previously [9]. A noncompetitive indirect ELISA (NCI-ELISA) was developed to detect and quantify SakA, EntP/SakA, and EntA/SakA in the supernatants of the recombinant bacterial and yeast producer cells. Briefly,

wells of flat-bottom polystyrene microtitre plates (Maxisorp, Nunc, Roskilde, Denmark) were coated overnight (4°C) with supernatants from *Lb. sakei* Lb706 or the recombinant LAB and yeast hosts. After addition of the anti-JJSA-KLH antibodies and the goat anti-rabbit immunoglobulin G peroxidase conjugate (Cappel Laboratories, West Chester, PA, USA), bound peroxidase was determined with ABTS (2,2'-azino-bis[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid]) (Sigma) as the substrate by measuring the absorbance of the wells at 405 nm with a Labsystems iEMS reader (Labsystems) with a built-in software package for data analysis.

**3.2.9. Purification of SakA, EntP/SakA and EntA/SakA, mass spectrometry analysis, and N-terminal amino acid sequencing.** SakA, EntP/SakA and EntA/SakA were purified from *Lb. sakei* Lb706 and *L. lactis* NZ9000 (pNUS), *L. lactis* NZ9000 (pNUPS), and *L. lactis* NZ9000 (pNUAS), respectively. SakA and EntP/SakA were also purified from *K. lactis* GG799SA and *P. pastoris* X-33PSA and *K. lactis* GG799PSA, respectively, as previously described (Sánchez et al., 2007; Borrero et al., 2011a). Briefly, supernatants from early stationary phase cultures of recombinant LAB strains and 0.5-l of the recombinant yeasts were precipitated with ammonium sulfate, desalted by gel filtration, and subjected to cationic-exchange and hydrophobic-interaction chromatography, followed by reverse-phase chromatography in a fast-protein liquid chromatography system (RP-FPLC) (GE Healthcare, Barcelona, Spain). Purified fractions were subjected to matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry, as previously described (Gutiérrez et al., 2006). For N-terminal sequencing, the purified bacteriocins were subjected to automatic Edman degradation and sequence on polyvinylidene difluoride membranes (PVDF) in a Procise 494 HT Sequencing System (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA), according to the manufacturer's standard methods, at the Centro de Investigaciones Biológicas (CIB, Madrid, Spain).

### 3.3. RESULTS

**3.3.1. Heterologous production and functional expression of SakA and two SakA-derived chimeras, EntP/SakA and EntA/SakA, by different LAB strains.** The mature bacteriocin SakA and two SakA-derived chimeras, EntP/SakA and EntA/SakA, fused to different signal peptides (SP<sub>usp45</sub>, SP<sub>entP</sub>, and SP<sub>hirJM79</sub>) and cloned into the protein expression vectors pNZ8048, under control of the inducible P<sub>nisA</sub> promoter, and into pMG36c, carrying the P<sub>32</sub> constitutive promoter, have been evaluated for their production and functional expression by *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 and *Lb. sakei* Lb706. Cloning of SP<sub>usp45</sub>, SP<sub>entP</sub>, and SP<sub>hirJM79</sub> fused to mature *sapA* (SakA) and *saiA* (SakI) into pNZ8048 permitted obtention of the NisA-induced derived vectors pNUS, pNPS, and pNHS, respectively, while cloning of SP<sub>usp45</sub> fused to mature *sapA* (SakA) and *saiA* (SakI) into pMG36c originated the constitutive pGUS. Similarly, cloning of the SP<sub>usp45</sub> fused to *entP/sapA* (EntP/SakA) and *saiA* (SakI) and fused to *entA/sapA* (EntA/SakA) and *saiA* (SakI) into pNZ8048 and pMG36c, permitted obtention of the NisA-induced derived vectors pNUPS and pNUAS, and the constitutive pGUPS and PGUAS respectively. Transformation of competent *L. lactis* subsp.

*cremoris* NZ9000 and *Lb. sakei* Lb706 with the pNZ8048- and pMG36c-derived vectors yielded recombinant strains which were further checked for bacteriocin production.

The production and functional expression of the SakA, EntP/SakA and EntA/SakA in the supernatants of the recombinant LAB strains was quantified by specific anti-SakA antibodies in an NCI-ELISA, and by a microtitre plate assay (MPA), respectively. None of the control strains transformed with the empty vectors, except the natural *Lb. sakei* Lb706 SakA producer, showed production of SakA. The production of SakA by *L. lactis* NZ9000 transformed with the pNZ8048 derivatives was 1,6 fold-higher for *L. lactis* NZ9000 (pNUS) and identical for *L. lactis* NZ9000 (pNHS), as compared to production of SakA by *Lb. sakei* Lb706, while it was non-detectable for *L. lactis* NZ9000 (pNPS). The production of EntP/SakA by *L. lactis* NZ9000 (pNUPS) and of EntA/SakA by *L. lactis* NZ9000 (pNUAS) was 1.5- and 1.3-fold higher, than that of SakA by *Lb. sakei* Lb706 (Table 3). The production of SakA and its chimeras by *L. lactis* NZ9000, transformed with the pMG36c-derivatives, was from a 0.9-fold lower to a 2.3-fold higher than production of SakA by *Lb. sakei* Lb706 (Table 3). Finally, the production of SakA, EntP/SakA, and EntA/SakA by *Lb. sakei* Lb706 transformed with the pMG36c-derivatives pGUS, pGUPS and pGUAS, respectively, was from a 1.1- to 2.2-fold higher than production of SakA by *Lb. sakei* Lb706 (**Table 3.3.**).

The evaluation of the antimicrobial activity of the recombinant LAB revealed that most of the *L. lactis* NZ9000 transformed hosts showed a much lower (from no activity to a 0.14-fold lower) antimicrobial activity than that of *Lb. sakei* Lb706, except for *L. lactis* NZ9000 (pNUPS), with a 1.9- and a 6.4-fold higher antimicrobial activity, depending on the indicator strain, than that of *Lb. sakei* Lb706. On the other hand, supernatants of *Lb. sakei* Lb706 (pGUS) showed a 2.3- and a 2.9-fold higher antimicrobial activity, while those of *Lb. sakei* Lb706 (pGUPS) and *Lb. sakei* Lb706 (pGUAS) showed a lower antimicrobial activity (0.36- to 0.62-fold lower) than *Lb. sakei* Lb706. It should be noted that, although most of the recombinant *L. lactis* NZ9000 and *Lb. sakei* Lb706 hosts produced a higher extracellular amount of SakA, EntP/SakA, and EntA/SakA than *Lb. sakei* Lb706, only *L. lactis* NZ9000 (pNUPS) and *Lb. sakei* Lb706 (pGUS) showed a 1.3- and 4.5-fold, and a 1.0- and 1.3-fold higher, respectively, specific antimicrobial activity than the SakA produced by *Lb. sakei* Lb706 (**Table 3.3.**).

**Table 3.3.** Bacteriocin production and antimicrobial activity of supernatants from recombinant LAB strains producing SakA and the EntP/SakA and EntA/SakA chimeras

Strain	Bacteriocin production (μg mg <sup>-1</sup> cell dry weight) <sup>a</sup>	Antimicrobial activity (BU mg <sup>-1</sup> cell dry weight) <sup>b</sup>		Specific antimicrobial activity (BU μg <sup>-1</sup> SakA) <sup>c</sup>	
		<i>Enterococcus faecium</i> T136	<i>Pediococcus damnosus</i> CECT4797	<i>Enterococcus faecium</i> T136	<i>Pediococcus damnosus</i> CECT4797
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>					
NZ9000 (pNZ8048)	NP	NA	NA	NE	NE
NZ9000 (pNUS, SakA)	3.4	124	300	37	89
NZ9000 (pNPS, SakA)	NP	NA	NA	NA	NA
NZ9000 (pNHS, SakA)	2.1	115	247	55	118
NZ9000 (pNUPS, EntP/SakA)	3.2	1,613	14,429	538	4,810
NZ9000 (pNUAS, EntA/SakA)	2.7	34	77	13	29
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>					
NZ9000 (pMG36c)	NP	NA	NA	NE	NE
NZ9000 (pGUS, SakA)	4.9	174	31	35	12
NZ9000 (pGUPS, EntP/SakA)	2.5	NA	434	NE	174
NZ9000 (pGUAS, EntA/SakA)	1.9	NA	NA	NE	NE
<i>Lactobacillus sakei</i>					
Lb706 (pMG36c)	2.0	956	2,095	478	1,047
Lb706 (pGUS, SakA)	4.7	1,943	6,538	413	1,391
Lb706 (pGUPS, EntP/SakA)	3.2	419	1,385	130	432
Lb706 (pGUAS, EntA/SakA)	2.4	306	858	128	357
<i>Lactobacillus sakei</i>					
Lb706 <sup>d</sup>	2.1	849	2,243	404	1,068

Most of the data are mean from two independent determinations in triplicate

<sup>a</sup> Production of SakA was calculated by a NCI-ELISA with antibodies specific for the C-terminal amino acid fragment of SakA. NP, no production

<sup>b</sup> Antimicrobial activity was calculated against *E. faecium* T136 (SakA<sup>s</sup>) and *P. damnosus* CECT4797 (SakA<sup>s</sup>). BU, bacteriocin units. NA, no activity

<sup>c</sup> Specific antimicrobial activity refers to the antimicrobial activity against *E. faecium* T136 and *P. damnosus* CECT4797 divided by the SakA produced. NE, not evaluable

<sup>d</sup> *Lb. sakei* Lb706 was used as control for the production and antimicrobial activity of SakA



Supernatants of the recombinant LAB strains also showed antagonistic activity against *Listeria* spp. by the MPA (**Table 3.4.**). The pattern of the antagonistic activity of their supernatants was similar to the observed against the indicator bacteria *E. faecium* T136 and *P. damnosus* CECT4797 (**Table 3.3.**). Supernatants of *L. lactis* NZ9000 (pNUS) showed a 0.04- to 0.63-fold lower antagonistic activity, those of *L. lactis* NZ9000 (pNUPS) a 1.0- to 5.4-fold higher antagonistic activity, and supernatants of *L. lactis* NZ9000 (pNUAS) from no activity to a 0.25-fold lower antagonistic activity, as compared to that of *Lb. sakei* Lb706 against the evaluated *Listeria* strains. A low antilisterial activity was also observed for *L. lactis* NZ9000 transformed with plasmids pGUS, pGUPS, and pGUAS (from no activity to a 1.0-fold antimicrobial activity as compared to that of *Lb. sakei* Lb706). However, *Lb. sakei* Lb706 (pGUS) showed a 1.3- to 5.0-fold higher antilisterial activity than *Lb. sakei* Lb706 whereas *Lb. sakei* Lb706 (pGUPS) and *Lb. sakei* Lb706 (pGUAS) showed a lower antilisterial activity than *Lb. sakei* Lb706 against *Listeria* spp. (**Table 3.4.**).

**3.3.2. Purification of SakA, EntP/SakA, and EntA/SakA, mass spectrometry analysis, and N-terminal amino acid sequencing.** The SakA, produced by *Lb. sakei* Lb706 and *L. lactis* (pNUS), the EntP/SakA produced by *L. lactis* (pNUPS) and the EntA/SakA produced by *L. lactis* (pNUAS) were purified to homogeneity following a previously used chromatographic procedure (results not shown). MALDI-TOF MS analysis of the purified SakA from *Lb. sakei* Lb706 showed a major peak of 4,306.9 Da close to its predicted molecular mass of 4,308.8 Da (**Fig. 3.1.A**), while the molecular mass of the SakA produced by *L. lactis* (pNUS) showed a much lower molecular mass of 3,805.3 Da (**Fig. 3.1.B**). Similarly, the molecular mass of the EntP/SakA, produced by *L. lactis* (pNUPS), was of 4,410.5 Da (**Fig. 3.1.C**) while that of the EntA/SakA, produced by *L. lactis* (pNUAS), showed a molecular mass of 3,805.8 Da (**Fig. 3.1.D**). Given that the obtained molecular mass of SakA and EntA/SakA, produced by *L. lactis* NZ9000, are almost identical among them but lower than their predicted theoretical molecular masses of 4,308.8 Da and 4,769.3 Da, respectively, it could occur that both could be abnormally processed. Accordingly, determination of the N-terminal amino acid sequence of both bacteriocins by Edman degradation demonstrated that they started with the amino acid sequence NGVY-, meaning that both have lost their first five (ARSYG-) and nine (TTHSGKYYG-) N-terminal amino acids, respectively, during processing and secretion out of the *L. lactis* NZ9000 producer hosts.

**Table 3.4.** Antimicrobial activity of supernatants from recombinant LAB strains against *Listeria* spp.<sup>a</sup>

Strain	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>				
	913	919	917	910	911	935	936	939	4032
<i>L. lactis</i> subesp. <i>cremoris</i>									
NZ9000 (pNUS, SakA)	61	45	56	46	57	25	58	56	50
NZ9000 (pNUPS, EntP/SakA)	1,012	348	1,178	335	392	453	1,423	1,312	1,758
NZ9000 (pNUAS, EntA/SakA)	32	26	28	NA	25	24	39	27	37
<i>L. lactis</i> subesp. <i>cremoris</i>									
NZ9000 (pGUS, SakA)	25	4	25	NA	23	24	30	27	34
NZ9000 (pGUPS, EntP/SakA)	98	60	88	45	93	101	187	89	184
NZ9000 (pGUAS, EntA/SakA)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	25	NA
<i>Lb. sakei</i>									
Lb706 (pMG36c)	203	204	412	149	75	346	815	691	781
Lb706 (pGUS, SakA)	624	1,257	1,541	749	387	584	2,286	1,729	2,743
Lb706 (pGUPS, EntP/SakA)	148	315	594	254	121	249	516	560	691
Lb706 (pGUAS, EntA/SakA)	100	216	369	176	110	180	418	272	428
<i>Lb. sakei</i>									
Lb706 <sup>b</sup>	185	272	443	175	90	370	655	1,266	543

Most of the data are mean from two independent determinations in triplicate

<sup>a</sup> Antimicrobial activity expressed in BU per milligrams of cell dry weight. NA, no activity

<sup>b</sup> *Lb. sakei* Lb706 was used as control for the antimicrobial activity of SakA

**3.3.3. Heterologous production and functional expression of SakA and EntP/SakA by *P. pastoris* and *K. lactis*.** Cloning of the PCR fragments containing the  $\alpha$ -factor Kex2 signal cleavage fused to mature *sapA* (SakA) or to mature *entP/sapA* (EntP/SakA) into the expression vectors pPICZ $\alpha$ A and pKLAC2 permitted the obtention of the *P. pastoris* X-33 and *K. lactis* GG799 derivatives, respectively, from which to determine the production and functional expression of SakA and EntP/SakA. Since the *P. pastoris* X-33SA, producer of SakA, and *P. pastoris* X-33PSA, producer of EntP/SakA, did not show a defined direct antimicrobial activity when streaked in selective agar plates with the SakA sensitive indicator *P. damnosus* CECT4797, they were selected on the basis of their high zeocin resistance ( $1,000 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). However, *K. lactis* GG799SA, producer of SakA, and *K. lactis* GG799PSA, producer of EntP/SakA, showed a low but defined direct antimicrobial activity against *P. damnosus* CECT4797. Colonies of *P. pastoris* X-33 and *K. lactis* GG799, transformed with the linearized control plasmids, were used as bacteriocin-negative controls to discard the possibility that the antimicrobial activity exerted by the recombinant hosts was due to metabolites other than bacteriocins.

The heterologous production and functional expression of the SakA and EntP/SakA, produced by the recombinant yeasts was determined by a NCI-ELISA and a MPA, respectively. The growth and production of SakA by *P. pastoris* X-33SA was lower than those of EntP/SakA by *P. pastoris* X-33PSA. The largest production of SakA and EntP/SakA by the recombinant *P. pastoris* producers was 1.8- and 24.2-fold higher, respectively, than production of SakA by *Lb. sakei* Lb706. However, neither the SakA nor the EntP/SakA produced by the *P. pastoris* producers showed a measurable antimicrobial activity (**Table 3.5.**). On the other hand, the growth of *K. lactis* GG799SA and *K. lactis* GG799PSA was similar while the production of SakA was 11.4-fold higher and that of the EntP/SakA 55.2-fold higher than production of SakA by *Lb. sakei* Lb706. However, the antimicrobial activity and the specific antimicrobial activity of either the SakA or the EntP/SakA produced by the *K. lactis* derivatives was much lower, ranging from 0.01- to 0.06-fold lower for both, than those of the SakA produced by *Lb. sakei* Lb706 (**Table 3.5.**).

**3.3.4. Purification and mass spectrometry analysis of the SakA and EntP/SakA produced by *P. pastoris* and *K. lactis*.** Although not a measurable or a very low antimicrobial activity was observed in the supernatants of the recombinant yeasts, their supernatants were subjected to protein purification following the procedure used for the recombinant LAB producers. Interestingly, a high antimicrobial activity was observed after the gel filtration, cationic exchange, hydrophobic interaction, and reverse-phase chromatography steps of all evaluated supernatants, except in those from *P. pastoris* X-33SA (results not shown). The theoretical molecular mass of SakA is 4,308.8 Da and that of the EntP/SakA is 4,410.0 Da. However, MALDI-TOF MS analysis of the purified EntP/SakA produced by *P. pastoris* X-33PSA showed a minor peptide fragment of 4,439.9 Da and major fragments of higher molecular mass (5.4 to 5.8 kDa). Similarly, the purified SakA from *K. lactis* GG799SA showed a fragment of 4,351.6 Da as well as fragments of higher molecular mass ( $> 4.4$  kDa), while the EntP/SakA produced by *K. lactis* G799PSA also showed a minor

peak of 4,285.3 Da and numerous fragments of higher molecular mass (5.5 to 6.1 kDa) (**Fig. 3.2.**).

### 3.4. DISCUSSION

If the use of bacteriocins as natural antimicrobial agents in food, veterinary, and medical applications is ever to meet the high expectations of the research community, a high level production of active bacteriocins in homologous and heterologous microbial hosts is essential. Production of bacteriocins by LAB is essentially based on the expression of native biosynthetic genes, by exchanging or replacing leader peptides and/or dedicated processing and secretion systems (ABC transporters) or by fusion of mature bacteriocins to signal peptides that act as secretion signals (Gutiérrez et al., 2006; Borrero et al., 2011a; Borrero et al., 2011b). Accordingly, optimization of bacteriocin gene expression and protein production would help the development of LAB as microbial cell factories for production and delivery of bacteriocins of biotechnological interest.

For the heterologous production of SakA and two SakA-derived chimeras, EntP/SakA and EntA/SakA, by *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 and *Lb. sakei* Lb706, the mature SakA and its chimeras were fused to different SPs. The SP<sub>usp45</sub>, SP<sub>entP</sub> and SP<sub>hirJM79</sub> encode the 27-amino-acid SP of the major extracellular Usp45 protein from *L. lactis* MG1363 (van Assendolk et al., 1990), the 27-amino-acid SP of the bacteriocin EntP (Cintas et al., 1997), and the 30-amino-acid SP of the bacteriocin hiracin JM79 (Sánchez et al., 2007), respectively. SakA holds the N-terminal ARS- amino acid sequence before the YGNGVxC consensus sequence of the class IIa bacteriocins. However, since positively charged amino acids immediately following the SP cleavage site may interfere with the secretion machinery or passage of the protein through the bacterial membrane (Le Loir et al., 2001), the EntP/SakA chimera was constructed by displacement of the arginine (R) residue from position +2 to position +3 of the mature bacteriocin, thus mimicking the N-terminal amino acid sequence of EntP (ATR), a bacteriocin homologous to SakA (Cintas et al., 1997) which is known to be overproduced and adequately processed by recombinant *L. lactis* and *P. pastoris* (Gutiérrez et al., 2005; Borrero et al., 2011a). The EntA/SakA chimera was also constructed to hold the TTHSGKY- amino acid sequence before the YGNGVxC consensus sequence of the class IIa bacteriocins thus mimicking the N-terminal amino acid sequence of EntA (Aymerich et al., 1996), which is also overproduced and adequately processed by recombinant *L. lactis* (Borrero et al., 2011b) and the yeasts *P. pastoris*, *K. lactis*, *Hansenula polymorpha*, and *Arxula adeninivorans* (Borrero et al., 2012).

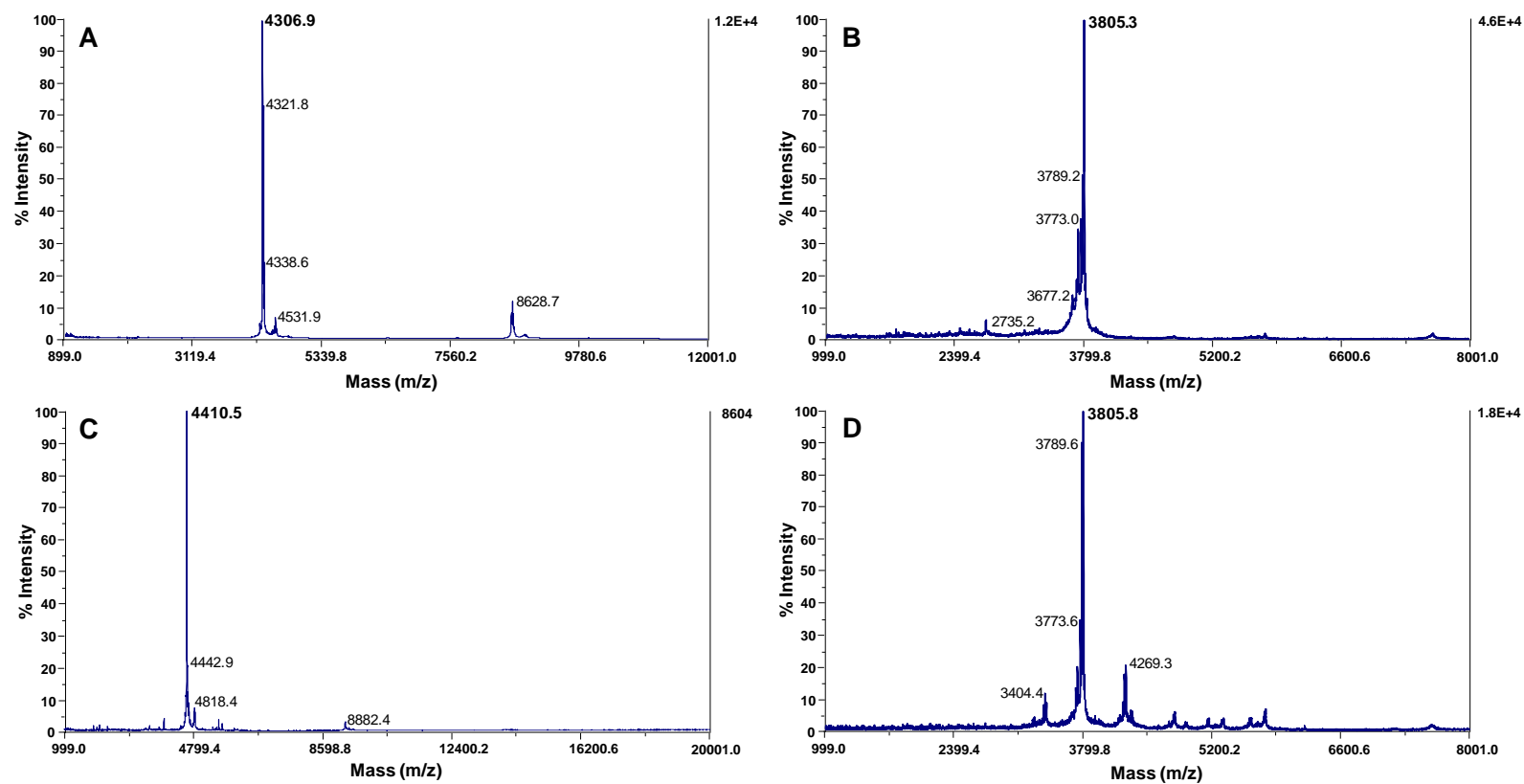
In this work, the development of specific anti-SakA antibodies and a NCI-ELISA has permitted the detection and quantification of SakA and its derived chimeras in the supernatants of the recombinant LAB strains, as well as the determination of their specific antimicrobial activity. Apparently, the production and antimicrobial activity of the SakA, EntP/SakA, and EntA/SakA produced by the recombinant LAB strains depend on the SP, the expression vector, and the host strain (**Table 3.3.**). The production of SakA and its derivatives by the recombinant LAB strains may also rely on the expression of the Saki

immunity (*saiA*) gene. It has been demonstrated that bacteriocin producers are protected from their own bacteriocins by the concomitant expression of a cognate immunity protein, that the expression of the immunity protein may increase bacteriocin production, and that the immunity proteins form a strong complex with the receptor proteins, thereby preventing producer cells from being killed (Borrero et al., 2011a; Kjos et al., 2011). The production and secretion of SakA by the recombinant *L. lactis* NZ9000 derivatives was observed when *sapA* was fused to SP<sub>usp45</sub> and SP<sub>hirJM79</sub>. However, the SP<sub>entP</sub> was unable to drive the production of SakA by *L. lactis* NZ9000. This was an unexpected result since the SP<sub>entP</sub> fused to mature pediocin PA-1 (PedA-1) (Martín et al., 2007a) and EntA (Martín et al., 2007b; Borrero et al., 2011b) permitted the production and secretion of both bacteriocins by different recombinant *L. lactis* hosts. In this context, secretion levels in Gram-positive bacteria may become not only affected by variations in the SPs but also by differences in the N-terminal part of the mature peptide or protein that may become only evident after fusion with some SP. It is possible that the N-terminal amino acid sequence of mature SakA may affect its secretion because positive charges at the N-terminus may affect export of the peptide by the Sec-dependent pathway (Le Lor et al., 2001). Mature SakA may also remain N-terminally associated to the cell membrane via a Sec-type signal peptide that is not cleaved off during secretion (Bøhle et al., 2011). It has been also hypothesized that variations in secretion capacities can be governed by post-transcriptional factors such as secondary structure of mRNA, codon usage and translation efficiency (Dobson et al., 2012). The molecular folding of SakA inside *L. lactis* may also maintain the prepeptide in a secretion-incompetent conformation (Mathiesen et al., 2009). In any case, protein secretion is a preferred means of protein expression in the development of LAB as cell factories for production of biologically active bacteriocins, and SP<sub>usp45</sub> fused to mature *sapA* and its chimeras adequately drive their production and secretion by the recombinant *L. lactis* and *Lb. sakei* hosts (**Table 3.3.**).

The role of the expression vectors in terms of production and antimicrobial activity of the target bacteriocins seems to depend on the host strain, genes of interest, promoter, and vector copy number (**Table 3.3.**). Plasmid pNZ8048 contains the high-copy number heterogramic replicon of the lactococcal plasmid pSH71 with a unique *NcoI* cleavage site, downstream of the *nisA* ribosomal binding sequence (RBS), used for translational fusions inducible by NisA (De Ruyter et al., 1996; Juipers et al., 1998). The expression vector pMG36c contains the low copy replication origin of the lactococcal plasmid pWV01 and the strong P<sub>32</sub> promoter to drive the constitutive transcription of inserted genes into the multicloning site (MCS) of pUC18 (van de Guchte et al., 1989). In this work, production of SakA and its chimeras by recombinant *L. lactis* and *Lb. sakei* hosts is not closely associated to the protein expression vector used, and this observation is in contrast to results in which production of bacteriocins is higher by pNZ8048-derived LAB transformants than by the pMG36c-derived ones (Gutiérrez et al., 2006; Martín et al., 2007a; Martín et al., 2007b; Sánchez et al., 2008; Borrero et al., 2011a; Borrero et al., 2011b). For optimization of protein expression, inducible systems are often considered superior to constitutive expression systems, since the former enable achievement of sufficient biomass prior to initiation of target protein expression and consequent metabolic burden of the cell. However, other factors

such as mRNA stability and secondary structure may steer protein production from the recombinant *L. lactis* and *Lb. sakei* hosts (Diep et al., 2009).

Of interest is also the observation that supernatants of most recombinant *L. lactis* NZ9000, transformed with the pNZ8048-derived expression vectors, show a lower antimicrobial activity than that expected from the production of SakA, EntP/SakA and EntA/SakA, except for *L. lactis* NZ9000 (pNUPS), with an antimicrobial activity in the range of that deduced from its production of EntP/SakA. On the other hand, all recombinant *L. lactis* NZ9000 hosts transformed with pMG36c-derived vectors show non-measurable or very poor antimicrobial activity (**Table 3.3.**). It may occur that the short induction time for bacteriocin production from nisin-inducible systems most probably prevent bacteriocins from attaching to cell walls, forming aggregates, and/or undergoing protease degradation (Gutiérrez et al., 2006; Borrero et al., 2011a). Not always a high bacteriocin production corresponds to a high antimicrobial activity. The low antimicrobial activity of the SakA and its chimeras produced by the recombinant LAB hosts may depend on many factors which are difficult to determine. It is possible that regulatory responses to secretion stress activate quality control networks involving folding factors and housekeeping proteases (Darmon et al., 2006). Differences in the Sec-dependent translocation and Sec machinery in the different LAB strains, differences in protein folding, and conformational modifications of the bacteriocin to a less extracellular active form may also account for a low antagonistic activity of the secreted bacteriocins (Sarvas et al., 2004). In this respect, the four cysteine residues present in SakA and presumably involved in the formation of two disulfide bonds (DSB) may also play a role in the folding, structural integrity, and antimicrobial activity of the produced bacteriocins (Freitas et al., 2005). Bacteriocin self-aggregation may also decrease the antagonistic activity of bacteriocins (Borrero et al., 2011b).



**Figure 3.1.** Mass spectrometry analysis of purified sakacin A from *Lb. sakei* Lb706 (A), purified sakacin A from *L. lactis* NZ9000 (pNUS) (B), purified enterocin P/sakacin A from *L. lactis* NZ9000 (pNUPS) (C), and purified enterocin A/sakacin A from *L. lactis* NZ9000 (pNUAS) (D). Bold numbers indicate the molecular mass in daltons of most of the observed peptide fragments.

MALDI-TOF MS analysis of the bacteriocins purified from recombinant *L. lactis* NZ9000 hosts revealed that SakA purified from *L. lactis* (pNUS) had a lower molecular mass than SakA purified from *Lb. sakei* Lb706. The purified EntP/SakA showed a major fragment of a molecular mass of 4,410.5 Da, corresponding to its expected size, while the EntA/SakA showed a major fragment of a molecular mass of 3,805.8 Da (**Fig. 3.1.**). Accordingly, since the theoretical molecular mass of SakA is 4,308.8 Da, that of EntP/SakA is 4,410.0 Da, and that of EntA/SakA is 4,769.3 Da, it seems that the SakA and the EntA/SakA produced by recombinant *L. lactis* NZ9000 are truncated bacteriocin fragments. Furthermore, all the analysed bacteriocins manifest the presence of major bacteriocin fragments with presumably none, one (+16 Da) and two (+32 Da) methionine residues (Met<sup>30</sup>, Met<sup>41</sup>) oxidized to MetSO (**Fig. 3.1.**). The oxidation of methionine residues during bacteriocin purification and recombinant production by LAB is common (Martín et al., 2007b; Borrero et al., 2011b). Determination of the N-terminal amino acid sequence of SakA and EntA/SakA by Edman degradation revealed that both bacteriocins started with the amino acid sequence NGVY-, demonstrating that both are truncated forms of the bacteriocins cloned in *L. lactis* NZ9000. As far as we know, this is the first report of N-terminal truncated bacteriocins produced by recombinant LAB. However, the truncated SakA and EntA/SakA, produced by *L. lactis* NZ9000, still maintain a lower, but measurable antimicrobial activity, perhaps due to the unespecific binding of the pediocin-like N-terminal sequences or their truncated forms to target cells through electrostatic interactions (Chen et al, 1997).

Transformation of *Lb. sakei* Lb706, natural producer of SakA, with pMG36c-derived vectors permitted a slightly higher production of SakA, EntP/SakA and EntA/SakA by all transformants. Furthermore, *Lb. sakei* Lb706 (pGUS), producer of SakA, showed higher antimicrobial activity than supernatants of *Lb. sakei* Lb706 (**Table 3.3.**), confirming the higher production and antimicrobial activity of bacteriocins produced by homologous LAB hosts (Borrero et al., 2011b). In *Lb. sakei* Lb706 modification of the N-terminal sequence of SakA resulted in lower antimicrobial activity in the supernatants of *Lb. sakei* Lb706 (pGUPS) and *Lb. sakei* Lb706 (pGUAS), further supporting that different amino acid sequences for the signal and mature peptides may be required for optimal production and secretion depending on the bacterial host.

Supernatants of *L. lactis* NZ9000 (pNUPS), producers of EntP/SakA and those of *Lb. sakei* Lb706 (pGUS), producers of SakA, showed up to a 5.4-fold higher antimicrobial activity against several *Listeria* spp. than any other recombinant LAB host (**Table 3.4.**). These recombinant LAB strains as overproducers of SakA and EntP/SakA, with higher antimicrobial activity than the supernatants of *Lb. sakei* Lb706, may be considered as appropriate cellular factories and an alternative to *Lb. sakei* Lb706 for production and recovery of the SakA and EntP/SakA antilisterial bacteriocins. Moreover, the use as bacteriocin producers of *Lactococcus* spp. and *Lactobacillus* spp. strains, generally recognized as safe (GRAS) and with a qualified presumption of safety (QPS), may also provide means by which the potential benefits of antimicrobial compounds can be exploited in food.



**Table 3.5.** Production and antimicrobial activity of SakA and EntP/SakA from supernatants of *P. pastoris* X-33SA, *P. pastoris* X-33PSA, *K. lactis* GG799SA, and *K. lactis* GG799PSA

Strain	Incubation time (h)	OD <sub>600</sub> <sup>a</sup>	Bacteriocin production (µg SakA ml <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	Antimicrobial activity (BU ml <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	Specific antimicrobial activity (BU µg <sup>-1</sup> SakA) <sup>d</sup>
<i>P. pastoris</i> X-33SA	0	0.1	ND	NA	NE
	2	0.1	ND	NA	NE
	4	0.2	ND	NA	NE
	6	0.3	1.9	NA	NE
	8	0.4	2.5	NA	NE
	10	0.4	2.7	NA	NE
	12	0.4	2.8	NA	NE
	24	0.4	3.6	NA	NE
	28	0.5	3.0	NA	NE
	36	1.6	0.9	NA	NE
<i>P. pastoris</i> X-33PSA	0	1.0	ND	NA	NE
	2	2.9	ND	NA	NE
	4	5.1	ND	NA	NE
	6	6.5	2.6	NA	NE
	8	7.3	6.4	NA	NE
	10	7.7	9.4	NA	NE
	12	8.8	11.7	NA	NE
	24	13.6	44.3	NA	NE
	28	11.5	48.5	NA	NE
	36	12.2	48.0	NA	NE
<i>K. lactis</i> GG799SA	0	1.0	ND	NA	NE
	2	2.4	ND	NA	NE
	4	4.4	ND	NA	NE
	6	7.2	7.5	20.1	2.7
	8	9.5	11.5	26.0	2.3
	10	14.3	22.9	32.5	1.4
	12	16.6	22.7	NA	NE
	24	17.1	ND	NA	NE
	28	18.4	ND	NA	NE
	36	19.2	ND	NA	NE
<i>K. lactis</i> GG799PSA	0	1.0	ND	NA	NE
	2	3.9	ND	NA	NE
	4	6.3	17.2	NA	NE
	6	8.8	40.6	22.7	0.6
	8	10.8	89.0	23.2	0.3
	10	14.2	110.4	24.9	0.2
	12	15.4	97.9	NA	NE
	24	18.6	90.0	NA	NE
	28	19.0	90.0	NA	NE
	36	20.1	87.2	NA	NE
<i>Lb. sakei</i> Lb706 <sup>e</sup>	15	1.2	2.0	830	415

Most of the data are mean from two independent determinations in triplicate

<sup>a</sup> OD<sub>600</sub>, optical density of cultures at 600 nm

<sup>b</sup> Production of SakA and EntP/SakA were calculated by using an NCI-ELISA with antibodies specific for the C-terminal amino acid fragment of SakA. ND, no detection

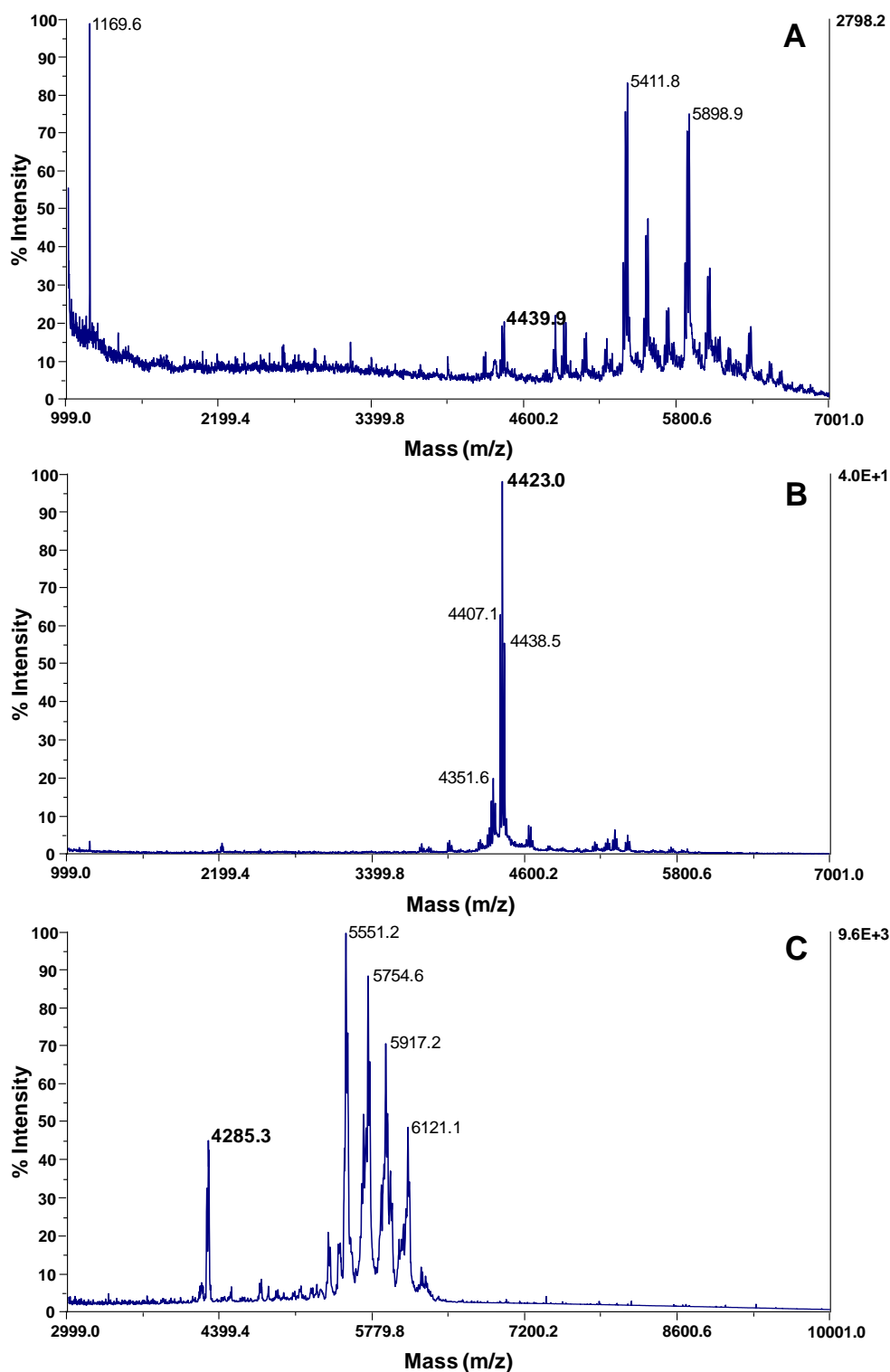
<sup>c</sup> Antimicrobial activity against *E. faecium* T136 (SakA<sup>s</sup>). BU, bacteriocin units. NA, no activity

<sup>d</sup> Specific antimicrobial activity refers to the antimicrobial activity against *E. faecium* T136 divided by the SakA and EntP/SakA produced. NE, not evaluable

<sup>e</sup> *Lb. sakei* Lb706 was used as control for the production and antimicrobial activity of SakA

Although heterologous expression systems for production of bacteriocins are being developed in bacteria, yeasts have not been yet fully exploited as alternative hosts for their production. However, a number of yeast platforms have been developed for the successful heterologous production of peptides and proteins (Gellisen et al., 2005; Böer et al., 2007). In this work, linearized pPICZαA and pKLAC2 protein expression vectors (Cregg et al., 2000; Colusi and Taron, 2005) containing SakA and SakA-derived chimeras have permitted the production of SakA and EntP/SakA by *P. pastoris* X-33SA and *P. pastoris* X-33PSA and the production and expression of these peptides by *K. lactis* GG799SA and *K. lactis* GG799PSA, although both expressed peptides are significantly less active than the SakA and EntP/SakA produced by *Lb. sakei* Lb706. All recombinant yeasts secreted SakA and EntP/SakA, although production of SakA was lower than that of EntP/SakA. While positively charged amino acids immediately following the SP cleavage site does not seem to interfere with the yeasts secretion machinery, displacement of the arginine (R) residue from position +2 to position +3 of the bacteriocin improves EntP/SakA secretion in *P. pastoris* X-33PSA and *K. lactis* GG799PSA. It should be noted that growth of *P. pastoris* X-33SA was severely impaired as compared to that of *P. pastoris* X-33PSA (**Table 3.5.**). Since one of the main bottlenecks in recombinant protein production is the inability of foreign peptides to reach their native conformation in heterologous yeast hosts, it may happen that incorrectly folded SakA is accumulated in the endoplasmic reticulum (ER), activating the unfolded protein response (UPR) and the ER associated degradation with generation of reactive oxygen species (ROS), leading to persistent ER stress conditions causing apoptosis and yeast death (Gasser et al., 2008). In this context, recent studies show that synthetic antimicrobial peptides induce the accumulation of ROS and hydroxyl radicals known to be important regulators of apoptosis and cell death in *Candida albicans* (Hwang et al., 2011).

The SakA and the EntP/SakA, produced by the recombinant *P. pastoris* and *K. lactis* hosts, showed no activity or a much lower antimicrobial activity than that deduced from their production (**Table 3.5.**). This observation was not unexpected since bacteriocins cloned into *Saccharomyces cerevisiae* (Schoeman et al., 1999; van Reenen et al., 2002; Basanta et al., 2009), *P. pastoris* (Beaulieu et al., 2005; Gutiérrez et al., 2005; Sánchez et al., 2008; Basanta et al., 2010; Borrero et al., 2012) and *K. lactis*, *Hansenula polymorpha* and *Arxula adenivorans* (Borrero et al., 2012) have been produced with variable success regarding its secretion and functional expression. In this work, MALDI-TOF MS analysis of the purified bacteriocins produced by the recombinant yeasts showed that, besides the presence of tentative oxidized forms of SakA and EntP/SakA, other fragments of high molecular mass were present (**Fig. 3.2.**). In this respect, these peptides could be associated to unknown biological compounds, as suggested for the inactive pediocin PA-1 (PedPA-1) produced by *P. pastoris* (Beaulieu et al., 2005). However, more likely both bacteriocins may have been subjected to post-translational modifications (PTMs) (**Fig. 3.2.**). Some common PTMs events in peptides and proteins are phosphorylation, acetylation, methylation, oxidation, formylation, disulfide bond formation, and N-linked and O-linked glycosylation (Zhao and Jensen, 2009).



**Figure 3.2.** Mass spectrometry analysis of purified enterocin P/sakacin A from *P. pastoris* X-33PSA (A), purified sakacin A from *K. lactis* GG799SA (B), and purified enterocin P/sakacin A from *K. lactis* GG799PSA (C). Bold numbers indicate the molecular mass in daltons of most of the observed peptide fragments.

The presence of cysteine and methionine residues in SakA and EntP/SakA (**Table 3.2.**) may lead to the formation of correct disulfide bridges but also to oxidation of these residues and the covalent attachment of different compounds to cysteine. Cysteine is susceptible to

chemical modifications such as glutathionylation and cysteinylolation. Similarly, the oxidation of methionine residues to MetSO is common during production of bacteriocins by yeasts (Basanta et al., 2010; Borrero et al., 2012). Glycosylation is also a common post-translational modification in eukaryotes involving linkage via the Asn-X-Ser/Thr sequence (N-glycosylation) or the side chain of serine and threonine (O-glycosylation). The absence in SakA and EntP/SakA of attachment sites for N-linkages precludes their N-glycosylation, but the presence of three serines and two threonines make them suitable for O-glycosylation. However, the correct processing, secretion and functional expression of the bacteriocins EntP (Gutiérrez et al., 2005), HirJM79 (Sánchez et al., 2008), and EntA (Borrero et al., 2012) produced by recombinant yeasts contrast with the low biological activity of the SakA and EntP/SakA produced by the *P. pastoris* and *K. lactis* producers. Misfolding of SakA and EntP/SakA and induction of the yeasts UPR may be responsible for apoptosis in *P. pastoris* X-33SA and for extensive PTMs in *P. pastoris* X-33PSA, *K. lactis* G799SA, and *K. lactis* G799PSA.

The use of synthetic hybrid bacteriocins and the synthesis of bacteriocins containing modified amino acid sequences by site-directed mutagenesis, error-prone PCR and gene shuffling techniques, have permitted the design of more active bacteriocins (Haugen et al., 2011). The production of bacteriocins in heterologous LAB and yeasts has also permitted the use of safer microbial hosts, to increase their production, antimicrobial activity, and specific antimicrobial activity as compared to that of the natural producers, to provide antimicrobial capabilities to LAB that may be useful as starters or protective cultures, or to design potential cell factories for production and delivery of bacteriocins of interest in food, medical, veterinary, and animal production applications (Borrero et al., 2012). However, further efforts should be performed to clarify those critical factors involved in the production and functional expression of different bacteriocins or their chimeras by recombinant LAB and yeasts.

### 3.5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express their gratitude to Prof. J. Kok (Department of Genetics, University of Groningen, The Netherlands) for supplying plasmid pMG36c. This work was partially supported by grants AGL2012-34829 from the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) and AGL2009-08348 from the Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN), by grant GR35-10A from the BSCH-UCM, and by grant S2009/AGR-1489 from the Comunidad de Madrid (CAM). J.J. Jiménez is recipient of a fellowship (FPI) from the Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN), J. Borrero held a research contract from the CAM, and L. Gútiez holds a fellowship (FPU) from the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC), Spain.

### 3.6. REFERENCES

- Axelsson, L. and Holck, A. (1995). The genes involved in production of and immunity to sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J. Bacteriol.* 177:2125-2137.
- Aymerich, T., Holo, H., Håverstein, L.S., Hugas, M., Garriga, M. and Nes, I.F. (1996). Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin-family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1676-1682.
- Basanta, A., Herranz, C., Gutiérrez, J., Criado, R., Hernández, P.E. and Cintas, L.M. (2009). Development of bacteriocinogenic strains of *Saccharomyces cerevisiae* heterologously expressing and secreting the leaderless enterocin L50 peptides L50A and L50B from *Enterococcus faecium* L50. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:2382-2392.
- Basanta, A., Gómez-Sala, B., Sánchez, J., Dzung, B.D., Herranz, C., Hernández, P.E. and Cintas, L.M. (2010). Use of the yeast *Pichia pastoris* as an expression host for secretion of enterocin L50, a leaderless two-peptide (L50A and L50B) bacteriocin from *Enterococcus faecium* L50. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:3314-3324.
- Beaulieu, L., Groleau, D., Míguez, C.B., Jetté, J.F., Aomari, H., and Subirade, M. (2005). Production of pediocin PA-1 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* reveals unexpected inhibition of its biological activity due to the presence of collagen-like material. *Prot. Expr. Purif.* 43:111-125.
- Böer, E., Steinborn, G., Kunze, G. and Gellissen, G. (2007). Yeast expression platforms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77:513-523.
- Bøhle, L.A., Riaz, T., Egge-Jacobsen, W., Skaugen, M., Busk, Ø.L., Eijsink, V.G.H. and Mathiesen, G. (2011). Identification of surface proteins in *Enterococcus faecalis* V583. *BMC Genomics* 12:135.
- Borrero, J., Jiménez, J.J., Gútiez, L., Herranz, C., Cintas, L.M. and Hernández, P.E. (2011a). Use of the *usp45* lactococcal secretion sequence signal sequence to drive the secretion and functional expression of enterococcal bacteriocins in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89:131-143.
- Borrero, J., Jiménez, J.J., Gútiez, L., Herranz, C., Cintas, L.M. and Hernández, P.E. (2011b). Protein expression vector and secretion signal peptide optimization to drive the production, secretion, and functional expression of the bacteriocin enterocin A in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* 156:76-86.
- Borrero, J., Kunze, G., Jiménez, J.J., Böer, E., Gútiez, L., Herranz, C., Cintas, L.M. and Hernández, P.E. (2012). Cloning, production and functional expression of the bacteriocin enterocin A, produced by *Enterococcus faecium* T136, by the yeasts *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha* and *Arxula adeninivorans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:5956-5961.
- Casaus, P., Nilsen, T., Cintas, L.M., Nes, I.F., Hernández, P.E. and Holo, H. (1997). Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* 143:2287-2294.

- Chen, Y., Ludescher, R.D. and Montville, T.J. (1997). Electrostatic interactions but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4770-4777.
- Cintas, L.M. (1995). Ph.D thesis. Universidad Autónoma de Madrid. Spain
- Cintas, L.M., Casaus, P., Håvarstein, L.S., Hernández, P.E. and Nes, I.F. (1997). Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel *sec*-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4321-4330.
- Colussi, P.A. and Taron, C.H. (2005). *Kluyveromyces lactis* LAC4 promoter variants that lack function in bacteria but retain full function in *K. lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:7092-7098.
- Cotter, P.D., Hill, C. and Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:777-788.
- Cregg, J.M., Cereghino, J.L., Shi, J. and Higgins, D.R. (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.* 16:23-52.
- Darmon, E., Noone, D., Masson, A., Bron, S., Kuipers, O.P., Devine, K.M. and van Dijk, J.M. (2002). A novel class of heat and secretion stress-responsive genes is controlled by the autoregulated CsrRS two-component system of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 184:5661-5671.
- De Ruyter, P.G.G.A., Kuipers, O.P. and de Vos, W.M. (1996). Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3662-3667.
- Diep, D.B., Axelsson, L., Grefslis, C. and Nes, I.F. (2000). The synthesis of the bacteriocin sakacin A is a temperature-sensitive process regulated by a pheromone peptide through a three-component regulatory system. *Microbiology* 146:2155-2160.
- Diep, D.B., Skaugen, M., Salehian, Z., Holo, H. and Nes, I.F. (2007). Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:2384-2389.
- Diep, D.B., Mathiesen, G., Eijsink, V.G.H. and Nes, I.F. (2009). Use of lactobacilli and their pheromone-based regulatory mechanism in gene expression and drug delivery. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 10:62-73.
- Dobson, A., Cotter, P.D., Ross, R.P. and Hill, C. (2012). Bacteriocin production: a probiotic trait? *Appl. Environ. Microbiol.* 78:1-6.
- Driessen, A.J.M. and Nouwen, N. (2007). Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu. Rev. Biochem.* 77:643-667.
- Freitas, D.A., Leclerc, S., Miyoshi, A., Oliveira, S.C., Sommer, P.S.M., Rodrigues, L., Correa, A., Gautier, M., Langella, P., Azevedo, V.A. and Le Loir, Y. (2005). Secretion of *Streptomyces tendae* antifungal protein 1 by *Lactococcus lactis*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38:1585-1592.
- Gasser, B., Saloheimo, M., Rinas, U., Dragosits, M., Rodríguez-Carmona, E., Baumann, K., Giuliani, M., Parrilli, E., Branduardi, P., Lang, C., Porro, D., Ferrer, P., Tutino, M.L., Mattanovich, D. and Villaverde, A. (2008). Protein folding and

- conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview. *Microb. Cell. Fact.* 7:4-11
- Gasson, M.J. (1983). Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J. Bacteriol.* 154:1-9.
- Gellissen, G., Kunze, G., Gaillardin, C., Cregg, J.M., Berardi, E., Veenhuis, M., and van der Klei, I. (2005). New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adeninivorans* and *Yarrowia lipolytica*. A comparison. *FEMS Yeast Res.* 5:1079-1096.
- Gutiérrez, J., Criado, R., Martín, M., Herranz, C., Cintas, L.M. and Hernández, P.E. (2005). Production of enterocin P, an antilisterial pediocin-like bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13, in *Pichia pastoris*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:3004-3008.
- Gutiérrez, J., Larsen, R., Cintas, L.M., Kok, J. and Hernández, P.E. (2006). High-level heterologous production and functional expression of the *sec*-dependent enterocin P from *Enterococcus faecium* P13 in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72:41-51.
- Haugen, G.S., Fimland, G. and Nissen-Meyer, J. (2011). Mutational analysis of residues in the helical region of the class IIa bacteriocin pediocin PA-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:1966-1972.
- Håvarstein, L.S., Diep, D.B. and Nes, I.F. (1995). A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitantly with export. *Mol. Microbiol.* 16, 229-240.
- Holck, A., Axelsson, L., Birkeland, S.E., Aukrust, T. and Blom, H. (1992). Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J. Gen. Microbiol.* 138:2715-2720.
- Hwang, B., Hwang, J.S., Lee, J. and Lee, D.G. (2011). The antimicrobial peptide psacothasin induces reactive oxygen species and triggers apoptosis in *Candida albicans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 405:267-271.
- Kjos, M., Borrero, J., Opsata, M., Birri, D.J., Holo, H., Cintas, L.M., Snipen, L., Hernández, P.E., Nes, I.F. and Diep, D.B. (2011). Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Microbiology* 157:3256-3267.
- Kuipers, O.P., de Ruyter, P.G.G.A., Kleerebezem, M. and de Vos, W.M. (1998). Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* 64:15-21.
- Le Loir, Y., Nouaille, S., Commissaire, J., Bretigny, L., Gruss, A. and Langella, P. (2001). Signal peptide and propeptide optimization for heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:4119-4127.
- Martín, M., Gutiérrez, J., Criado, R., Herranz, C., Cintas, L.M. and Hernández, P.E. (2007a). Chimeras of mature pediocin PA-1 fused to the signal peptide of enterocin P permits the cloning, production, and expression of pediocin PA-1 in *Lactococcus lactis*. *J. Food. Prot.* 70:2792-2798.

- Martín, M., Gutiérrez, J., Criado, R., Herranz, C., Cintas, L.M. and Hernández, P.E. (2007b). Cloning, production and expression of the bacteriocin enterocin A produced by *Enterococcus faecium* PLBC21 in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76:667-675.
- Mathiesen, G., Svee, A., Brurberg, M.B., Fredriksen, L., Axelsson, L. and Eijsink, V.G.H. (2009). Genome-wide analysis of signal peptide functionality in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *BMC Genomics* 10:425. doi:10.1186/1471-2164-10-425.
- Montalbán-López, M., Sánchez-Hidalgo, M., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M. and Maqueda, M. (2011). Are bacteriocins underexploited? Novel applications for old antimicrobials. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 12:1205-1220.
- Natale, P., Brügger, T. and Driessen, A.J.M. (2008). Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane: distinct translocases and mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1778:1735-1756.
- Nes, I.F., Yoon, S.S. and Diep, D.B. (2007). Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: A review. *Food Sci. Biotechnol.* 16:675-690.
- Sánchez, J., Diep, D.B., Herranz, C., Nes, I.F., Cintas, L.M. and Hernández, P.E. (2007). Amino acid and nucleotide sequence, adjacent genes, and heterologous expression of hiracin JM79, a Sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *FEMS Microbiol. Lett.* 270:227-236.
- Sánchez, J., Borrero, J., Gómez-Sala, B., Basanta, A., Herranz, C., Cintas, L.M. and Hernández, P.E. (2008). Cloning and heterologous production of hiracin JM79, a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae*, in lactic acid bacteria and *Pichia pastoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:2471-2479.
- Sarvas, M., Harwood, C.R., Bron, S. and van Dijk, J.M. (2004). Post-translocational folding of secretory proteins in Gram-positive bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1694:311-327.
- Schoeman, H., Vivier, M.A., du Toit, M., Dicks, L.M.T. and Pretorius, I.S. (1999). The development of bactericidal yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (*pedA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15:647-656.
- van Asseldonk, M., Rutten, G., Oteman, M., Siezen, R.J., de Vos, W.M. and Simons, G. (1990). Cloning of *usp45*, a gene encoding a secreted protein from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MG1363. *Gene* 95:155-160.
- van de Guchte, M., van der Vossen, J.M.B.M., Kok, J. and Vemena, G. (1989). Construction of a lactococcal expression vector: expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:224-228.
- van Reenen, C.A., Chikindas, M.L., van Zyl, W.H. and Dicks L.M.T. (2002). Characterization and heterologous expression of a class IIa bacteriocin, plantaricin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food. Microbiol.* 81:29-40.



Zhao, Y. and Jensen, O.N. (2009). Modification-specific proteomics: strategies for characterization of post-translational modifications using enrichment techniques. *Proteomics* 9:4632-4641.

# CAPÍTULO / CHAPTER 4

**Uso de genes sintéticos para la clonación, producción y expresión  
funcional de las bacteriocinas enterocina A y bacteriocina E 50-52  
por *Pichia pastoris* y *Kluyveromyces lactis***

---

**Use of synthetic genes for cloning, production and functional  
expressin of the bactericins enterocin A and bactericin E 50-52 by  
*Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis***



## ABSTRACT

The use of synthetic genes may constitute a successful approach for the heterologous production and functional expression of bacterial antimicrobial peptides (bacteriocins) by recombinant yeasts. In this work, synthetic genes with adapted codon usage designed from the mature amino acid sequence of the bacteriocin enterocin A (EntA), produced by *Enterococcus faecium* T136, and the mature bacteriocin E 50-52 (BacE50-52) produced by *E. faecium* NRRL B-32746, were synthesized. The synthetic *entA* and *bacE50-52* were cloned into the protein expression vectors pPICZαA and pKLAC2 for transformation of derived vectors into *Pichia pastoris* X-33 and *Kluyveromyces lactis* GG799, respectively. The recombinant vectors were linearized and transformed into competent cells selecting for *P. pastoris* X-33EAS (*entA*), *P. pastoris* X-33BE50-52S (*bacE50-52*), *K. lactis* GG799EAS (*entA*), and *K. lactis* GG799BE50-52S (*bacE50-52*). *P. pastoris* X-33EAS and *K. lactis* GG799EAS, but not *P. pastoris* X-33BE50-52S and *K. lactis* GG799BE50-52S showed antimicrobial activity in their supernatants. However, purification of the supernatants of the producer yeasts permitted recovery of the bacteriocins EntA and BacE50-52. Both purified bacteriocins were active against Gram-positive bacteria such as *Listeria monocytogenes* but not against Gram-negative bacteria, including *Campylobacter jejuni*.

**Keywords:** Synthetic genes; Bacteriocins; Enterocin A; Bacteriocin E 50-52; Heterologous production; *Pichia pastoris*; *Kluyveromyces lactis*



## 4.1. INTRODUCTION

The use of synthetic genes for production of proteins by heterologous microbial hosts may become a useful tool when the DNA sequence encoding the protein of interest is not available or difficult to obtain or when the producer species show a non-universal genetic code (Denis-Quanquin et al., 2007). The optimization of gene sequences to enhance protein production is also important for industry applications when low-cost and large-scale production are demanded (Gao et al., 2012). Furthermore, the replacement of native gene sequences with the preferred codon usage of the producer host cells can lead to significant increases in protein synthesis and overall protein yield (Öberg et al., 2011). The adaptation of codon usage for protein expression in yeasts appears to enhance protein production and secretion since translation efficiency and transport across the endoplasmic reticulum (ER) are favoured (Ward et al., 2011; Gao et al., 2012).

Bacteriocins are ribosomally synthesized antimicrobial peptides secreted by bacteria, and those produced by lactic acid bacteria (LAB) attract considerable interest as natural and nontoxic food preservatives, for human and veterinary applications, and in the animal production field (Borrero et al., 2011b; Montalbán-López et al., 2011). Furthermore, among the LAB the enterococci produce a diverse and heterogeneous group of bacteriocins, coined enterocins, which differ with respect to their antimicrobial activities, structures, processing, and secretion mechanisms (Franz et al., 2007). Most bacteriocins, including enterocins, are synthesized as biologically inactive precursors or prepeptides containing an N-terminal extension. The mature peptides are often cationic, amphiphilic molecules of 20 to 60 amino acid residues that are generally classified into two main classes: the lantibiotics or class I that consist of modified bacteriocins, and the class II or nonmodified bacteriocins, which are further subdivided into class IIa or pediocin-like, strong antilisterial bacteriocins with the N-terminal consensus sequence YGNGVxC, class IIb or two-peptide bacteriocins, class IIc or cyclic bacteriocins, and the class IId consisting of linear non-pediocin-like one-peptide bacteriocins (Cotter et al., 2005; Drider et al., 2006; Nes et al., 2007). Additional subgroups have been suggested for leaderless peptides, circular bacteriocins, linear peptides derived from large proteins, and the glycosylated bacteriocins (Kjos et al., 2011). However, because enterocins may be produced by enterococcal species carrying antibiotic resistance genes or genes coding for potential virulence factors due to hygienic, safety, and biotechnological reasons the production of enterocins in heterologous microbial hosts is being actively evaluated (Gutiérrez et al., 2006; Borrero et al., 2011b).

The enterocin A (EntA) is a class IIa bacteriocin with two disulfide bridges whose synthesis is directed by a gene cassette that encodes the *entAIFKRTD* operon and from which *entA* encodes the enterocin A prepeptide synthesized as an 18-amino-acid leader sequence and the 47-amino-acid mature bacteriocin (Nilsen et al., 1998; O'Keefe et al., 1999). Furthermore, the potent antilisterial activity of EntA has driven interest for its overproduction by heterologous hosts throughout fusion of mature EntA to signal peptides that acts as secretion signals (Borrero et al., 2011b; Borrero et al., 2012). Several bacteriocins have been also identified from chicken comensal bacteria that are active against Gram-positive and

Gram-negative bacteria, reduce *Campylobacter* colonization in poultry, and are being directed toward on-farm control of this foodborne human pathogen (Hoang et al., 2011; Messaoudi et al., 2012). In this context, the bacteriocin E 50-52 (BacE50-52) is also a class IIa, 39-amino-acid mature bacteriocin, produced by *E. faecium* NRRL B-30746, capable of killing a wide variety of Gram-negative and Gram-positive pathogens under *in vitro* and *in vivo* conditions (Svetoch et al., 2008a, b, 2009, 2010). However, to our knowledge the gene encoding this bacteriocin has not been yet sequenced. Accordingly, we report in this work the synthesis of *entA* and *bacE50-52* designed from the amino acid sequence of mature EntA and BacE50-52 and with adapted codon usage for expression by *P. pastoris* and *K. lactis*, their cloning into appropriate protein expression vectors, and the production and functional expression of EntA and BacE50-52 by recombinant *P. pastoris* X-33 and *K. lactis* GG799 derivatives.

## 4.2. MATERIAL AND METHODS

**4.2.1. Microbial strains, plasmids, and growth conditions.** The microbial strains and plasmids used in this study are listed in **Table 4.1**. The enterococci were grown in MRS broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) at 32°C. *P. pastoris* X-33 (Invitrogen S.A., Barcelona, Spain) and *K. lactis* GG799 (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) were cultured in the YPD medium (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) at 30°C with shaking (200 to 250 rpm). *Escherichia coli* JM109 (Invitrogen S.A.) was grown in LB broth (Sigma-Aldrich) at 37°C with shaking. *Pediococcus damnosus* CECT4797 was also grown in MRS broth (Oxoid) at 37 °C. All *Listeria* spp., *Staphylococcus aureus* 4-03937 and *Streptococcus pneumoniae* FQ35 were cultured in BHI broth (Oxoid) at 37°C. *Aeromonas salmonicida* LMG3776 and *Yersinia ruckeri* LMG3279 were grown in TSB (Oxoid) at 28°C. *Vibrio campbellii* LMG21363 was grown in TSB supplemented with 1% NaCl, at 28°C. *Salmonella typhimurium* CECT443 was grown in TSB at 37°C. *Campylobacter jejuni* ATCC33560 and *C. jejuni* NCTC11168 were grown in BHI broth (Oxoid) supplemented with 1% defibrinated horse serum (BDBiosciences, San Jose, CA, USA) at 37 °C in microaerophilic conditions. *Clostridium perfringens* CECT821 was grown in RCM (Oxoid) at 37°C in anaerobic conditions. *S. pneumoniae* FQ35 was grown at 37°C on Blood Agar Plates (BAP) (Biomérieux S.A., Marcy l'Etoile, France). When necessary, zeocin (Invitrogen) and ampicillin (Sigma-Aldrich) were used at a concentration of 25 and 50 µg/ml, respectively. Cell dry weights of late exponential phase bacterial and yeast cultures, expressed as cell dry mass, were determined gravimetrically. All *Listeria* spp. were obtained from the CECT (Colección Española de Cultivo Tipo, Valencia, Spain), *S. aureus* 4-03937 was obtained from VISAVET (Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain), and *S. pneumoniae* FQ35 was obtained from the SMRC (Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain). Strains with the letters LMG were obtained from the Laboratorium voor Microbiologie (University of Ghent, Ghent, Belgium), those with ATCC from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA), and those with NCTC from the National Collection of Type Cultures (London, UK).

**Table 4.1.** Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Description <sup>a</sup>	Source and/or reference <sup>b</sup>
<b>Strains</b>		
<i>Enterococcus faecium</i>		
T136	Enterocin A and B producer; MPA and ADT indicator; Indicator strain	DNBTA; [22]
P13	Enterocin P producer; MPA and ADT indicator; Indicator strain	DNBTA; [49]
<i>Escherichia coli</i> JM109	Selection of recombinant plasmids	Promega
<i>P. pastoris</i> X-33	Yeast producer	Invitrogen Life Technologies
<i>K. lactis</i> GG799	Yeast producer	New England Biolabs
<b>Plasmids</b>		
pMA	Amp <sup>r</sup> ; pDFB36 derivative; <i>Plac-motA lacIq</i>	GeneArt
pPICZαA	Zeo <sup>r</sup> ; integrative plasmid carrying the secretion signal sequence from the <i>S. cerevisiae</i> α factor prepropeptide and functional sites for the integration at the 5'AOX1 locus of <i>P. pastoris</i> X-33	Invitrogen Life Technologies
pKLAC2	Amp <sup>r</sup> ; integrative plasmid carrying the <i>Aspergillus nidulans</i> acetamidase gene ( <i>amdS</i> ), the secretion signal sequence from the <i>S. cerevisiae</i> α factor prepropeptide and functional sites for the integration at the LAC4 locus of <i>K. lactis</i> GG799	New England Biolabs
pMAPEAS	Amp <sup>r</sup> ; pMA plasmid carrying the <i>entA</i> synthetic gen with the <i>P. pastoris</i> codon usage	GeneArt
pMAKEAS	Amp <sup>r</sup> ; pMA plasmid carrying the <i>entA</i> synthetic gen with the <i>K. lactis</i> codon usage	GeneArt
pMAPBE50-52S	Amp <sup>r</sup> ; pMA plasmid carrying the <i>bacE50-52</i> synthetic gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage	GeneArt
pMAKBE50-52S	Amp <sup>r</sup> ; pMA plasmid carrying the <i>bacE 50-52</i> synthetic gene with the <i>K. lactis</i> codon usage.	GeneArt
pPICEAS	pPICZαA derivative carrying the PCR product KR-PEAS	This work
pPICBE50-52S	pPICZαA derivative carrying the PCR product KR-PBE50-52S	This work
pKLEAS	pKLAC2 derivative carrying the PCR product KR-KEAS	This work
pKLE50-52S	pKLAC2 derivative carrying the PCR product KR-KBE50-52S	This work

<sup>a</sup> ADT, agar well diffusion test; MPA, microtitre plate assay; Amp<sup>r</sup>, ampicilin resistance; Kan<sup>r</sup>, kanamicin resistance; Zeo<sup>r</sup>, zeocin resistance.

<sup>b</sup> DNBTA, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid (Madrid, Spain).



**4.2.2. Basic genetic techniques and enzymes.** The known amino acid sequence of mature EntA, produced by *E. faecium* T136 (Casaus et al., 1997) or *E. faecium* CTC492 (Aymerich et al., 1996) (GenBank nº X94181) and that of the BacE50-52, produced by *E. faecium* NRRL B-32746 (Svetoch et al., 2008a) (GenBank nº P85148), were used as the amino acid sequences from which to design their preferred codon usage for production by *P. pastoris* X-33 and *K. lactis* GG799. The nucleotide sequence the *entA* and the *bacE50-52* synthetic genes contained a 5'-nucleotide appendix including a *XhoI* restriction site and a 3'-nucleotide appendix including the stop codon (TAA) and the *NotI* restriction site (**Table 4.2**). Both synthetic genes were supplied by GeneArt® (Life Technologies, Paisley, UK). DNA restriction enzymes were supplied by New England BioLabs. Ligations were performed with the T4 DNA ligase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). *E. coli* JM109 and *K. lactis* GG799 competent cells were transformed as described by the supplier. Competent *P. pastoris* X-33 cells were obtained as recommended by the supplier and electroporation of competent cells was performed as previously described (Gutiérrez et al., 2005). Electrocompetent cells were transformed with a Gene Pulser™ and Pulse Controller apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

**4.2.3. PCR amplification and nucleotide sequencing.** Oligonucleotide primers were obtained from Sigma-Genosys Ltd., (Cambridge, UK). PCR-amplifications were performed in 50 µl reaction mixtures containing 1 µl of purified DNA, 70 pmol of each primer, and 1 U of Platinum® Pfx DNA Polymerase (Invitrogen S.A.) in a DNA thermal cycler Techgene (Techne, Cambridge, UK). The PCR-generated fragments were purified by a NucleoSpin® Extract II Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co., Düren, Germany) for cloning and nucleotide sequencing. Nucleotide sequencing of the purified PCR products was performed using the ABI PRISM® BigDye™ Terminator cycle sequence reaction kit and the automatic DNA sequencer ABI PRISM, model 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), at the Unidad de Genómica, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid (UCM), Madrid, Spain.

**4.2.4. Cloning of the *entA* and *bacE50-52* synthetic genes in *P. pastoris* X-33 and *K. lactis* GG799, and antimicrobial activity of the transformants.** The primers and inserts used for construction of the recombinant plasmids are listed in **Table 4.2**. Derivatives of plasmids pPICZαA and pKLAC2 were constructed as follows: primers JPKE-F and JPKE-R were used for PCR amplification from plasmids pMAPEAS, pMAKEAS, pMAPBE50-52S and pMAKBE50-52S of the fragments KR-PEAS, KR-KEAS, KR-PBE50-52S and KR-KBE50-52S, respectively, carrying the α-factor Kex2 signal-protease cleavage site without the Glu-Ala spacer, fused to the synthetic *entA* and *bacE50-52* genes. Digestion of the above cited fragments with the *XhoI*-*NotI* restriction enzymes permitted ligation of the resulting 195-bp and 165-bp *XhoI*-*NotI*-cleavage fragments into pPICZαA and pKLAC2, digested with the same enzymes, to generate the plasmid-derived vectors pPICEAS, pKLEAS, pPICBE50-52S and pKLBE50-52S, respectively. Competent *E. coli* JM109 cells were transformed with the above cited vectors and the resulting transformants were confirmed by PCR amplification and sequencing. Subsequently, the *SacI*-linearized pPICEAS and pPICBE50-52S vectors and the *SacII*-linearized pKLEAS and pKLBE50-52S plasmid derivatives were used to transform

*P. pastoris* X-33 and *K. lactis* GG799, respectively. The *P. pastoris* X-33EAS and *P. pastoris* X-33BE50S transformants were selected from YPD agar supplemented with zeocin (100 and 1,000 µg/ml) and sorbitol (1 M). The *K. lactis* GG799EAS and *K. lactis* GG799BE50-52S transformants were selected on YCB (New England Biolabs) agar supplemented with Tris-HCl Buffer (30 mM) and acetamide (5 mM). Plates were incubated at 30°C for 3-5 days. The presence of the integrated pPICEAS, pKLEAS, pPICBE50-52S and pKLBE50-52S linearized plasmids in the genome of the transformed yeasts was confirmed by bacteriocinogenicity tests and sequencing of the inserts.

The antimicrobial activity of individual *P. pastoris* X-33EAS, *P. pastoris* X-33BE50-52S, *K. lactis* GG799EAS and *K. lactis* GG799BE50-52S transformants was screened by a stab-on-agar-test (SOAT). Briefly, the *P. pastoris* X-33EAS and *P. pastoris* X-33BE50S transformants were streaked onto BMMY buffered methanol complex medium (1% yeast extract, 2% peptone, 100 mM potassium phosphate [pH 6], 1.34% yeast nitrogen base [YNB] without amino-acids,  $4 \times 10^{-5}$ % biotin, 0.5% methanol) agar and grown at 30°C to induce production of the bacteriocins. During the incubation period, methanol was added daily to the plates at 0.5% (v/v) final concentration to maintain the induction. The *K. lactis* GG799EAS and *K. lactis* GG799BE50-52S transformants were streaked onto YPGal (1% yeast extract, 2% peptone and 2% galactose) agar. After incubation of the plates at 30°C for 48 h, 40 ml of MRS soft-agar containing  $1 \times 10^5$  cfu/ml of the indicator microorganisms *E. faecium* P13 (EntA<sup>s</sup>) or *P. damnosus* CECT4797 (BacE50-52<sup>s</sup>) were added to the plates that were incubated at 30°C overnight.

To determine the growth of the recombinant yeasts and the antimicrobial activity of their supernatants, the *P. pastoris* X-33EAS bacteriocin producers were grown in the buffered glycerol complex medium BMGY (1% yeast extract, 2% peptone, 100 mM potassium phosphate [pH 6], 1.34% YNB without amino-acids,  $4 \times 10^{-5}$ % biotin, 1% glycerol) at 30°C, until an optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of approximately 2 to 6 was reached. Cells were then harvested by centrifugation (5,000 x g at 4°C for 10 min), and resuspended to an OD<sub>600</sub> of 1 in the BMMY medium. Similarly, the *K. lactis* GG799EAS selected clones were grown in the YPD medium until an OD<sub>600</sub> of approximately 2 to 6 was reached. Cells were then harvested by centrifugation (5,000 x g at 4°C for 10 min), washed with YPGal (1% yeast extract, 2% peptone and 2% galactose) and resuspended to an OD<sub>600</sub> of 1 in fresh YPGal medium. The *P. pastoris* and *K. lactis* cultures were incubated at 30°C for 36 h with shaking (250 rpm). During growth, samples were collected periodically for determination of their OD<sub>600</sub>, bacteriocin production, and the antimicrobial activity of their supernatants by an agar well diffusion test (ADT) and a microtiter plate assay (MPA) [12], using *E. faecium* P13 (EntA<sup>s</sup>) as the indicator microorganism. With the MPA, growth inhibition of the sensitive culture was measured spectrophotometrically at 620 nm with a microtitre Labsystems iEMS plate reader (Labsystems, Helsinki, Finland). One bacteriocin unit (BU) was defined as the reciprocal of the highest dilution of the bacteriocin causing 50% growth inhibition (50% of the turbidity of the control culture without bacteriocin).

**Table 4.2.** Primers and PCR products used in this study

Primer or PCR product	Nucleotide sequence (5'-3') or description	Amplification
Primers		
JPKE-F	GAGGTACCGAATTCTCGAGAAAAGAAC	KR-PEAS, KR-KEAS, KR-PBE50-52S, KR KBE50-52S
JPKE-R	AGCTCATAAGTTGCGGCCGCTATTTA	
PCR products		
KR-PEAS	195-bp <i>XhoI/NotI</i> fragment containing the $\alpha$ -factor Kex2 signal cleavage fused to the mature synthetic <i>entA</i> gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage	
KR-KEAS	195-bp <i>XhoI/NotI</i> fragment containing the $\alpha$ -factor Kex2 signal cleavage fused to the mature synthetic <i>entA</i> gene with the <i>K. lactis</i> codon usage	
KR-PBE50S	165-bp <i>XhoI/NotI</i> fragment containing the $\alpha$ -factor Kex2 signal cleavage fused to the mature synthetic <i>bacE50-52</i> gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage	
KR-KBE50S	165-bp <i>XhoI/NotI</i> fragment containing the $\alpha$ -factor Kex2 signal cleavage fused to the mature synthetic <i>bacE50-52</i> gene with the <i>K. lactis</i> codon usage	
Bacteriocins		
EntA (Amino acid sequence)	TTHSGKYYGNGVYCTKNKCTVDWAKATTCIAGMSIGGFLGGAIPGKC	
EntA ( <i>P. pastoris</i> codon usage)	actactcactccggaagtactacggtaacgggtgtttactgtactaagaacaagtgtactgttgactgggctaaggctac tacttgatcgcctggatgtccatcgggtggttttttgggtggtgctatcccaggtaagtgttaa	
EntA ( <i>K. lactis</i> codon usage)	actactcattccggaagtactacggtaatgggtgtttactgtaccaagaacaagtgtactgttgattgggctaaggctac tacttgattgtcgtggatgtctattgggtggtttcttgggtggtgctattccaggtaaatgttaa	
BacE50-52 (Amino acid sequence)	TTKNYNGVCSNVWCQCGNVWASCNLATGCAAWLCKLA	
BacE50-52 ( <i>P. pastoris</i> codon usage)	actactaagaactacggtaacgggtgtttgcaactccgttaactgggtgtcagtggtgtaacgtttgggcttcctgtaacttggc tactgggtgtgctgcttgggtgtgtaaattggcctaa	
BacE50-52 ( <i>K. lactis</i> codon usage)	accactaagaattacggtaacgggtgtgtgtaactctgttaattgggtgtcaatgtggtgtaacgtttgggcttcctgtaatttggc tactgggtgtgctgcttgggtgtgtaaattggcctaa	

**4.2.5. ELISA for quantification of the production of EntA.** Rabbit polyclonal antibodies with predetermined specificity for EntA and a noncompetitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay (NCI-ELISA) were used to detect and quantify EntA in the supernatants of the producer cells (Borrero et al., 2012b). Briefly, wells of flat-bottom polystyrene microtitre plates (Maxisorp, Nunc, Roskilde, Denmark) were coated overnight (4°C) with supernatants from *E. faecium* T136 and the EntA-producing yeasts. After addition of the anti-EntA antibodies and the goat anti-rabbit immunoglobulin G peroxidase conjugate (Cappel Laboratories, West Chester, PA, USA), bound peroxidase was determined with ABTS (2,2'-azino-bis[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid]) (Sigma-Aldrich) as the substrate by measuring the absorbance of the wells at 405 nm with a Labsystems iEMS reader (Labsystems) with a built-in software package for data analysis.

**4.2.6. Purification of the bacteriocins EntA and BacE50-52, and mass spectrometry analysis.** EntA was purified from *E. faecium* T136, *P. pastoris* X-33EAS and *K. lactis* GG799EAS while bacteriocin BacE50-52 was purified from *P. pastoris* X-33BE50-52S and *K. lactis* GG799BE50-52S, using a previously described procedure (Gutiérrez et al., 2006; Sánchez et al., 2007). Briefly, supernatants from early stationary phase 1-L cultures of *E. faecium* T136 and 0.5-L of the recombinant yeasts were precipitated with ammonium sulfate, desalted by gel filtration, and subjected to cation-exchange and hydrophobic-interaction chromatography, followed by reverse-phase chromatography in a fast-protein liquid chromatography system (RP-FPLC) (GE Healthcare, Barcelona, Spain). Purified fractions were subjected to matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry, as previously described (Gutiérrez et al., 2006). The antimicrobial activity of the purified bacteriocins was evaluated against *P. damnosus* CECT4797 (EntA<sup>s</sup> and BacE50-52<sup>s</sup>) but also against *Listeria* spp. and other Gram-positive and Gram-negative microorganisms, using the MPA.

### 4.3. RESULTS

**4.3.1. Heterologous production and functional expression of EntA and BacE50-52 by recombinant *P. pastoris* X-33 and *K. lactis* GG799.** The cloning of PCR-amplified fragments with the synthetic mature *entA* or *bacE50-52* into the protein expression vectors pPICZαA and pKLAC2 resulted in the recombinant plasmids listed in **Table 4.1**. Similarly, transformation of the linearized plasmids into competent yeasts permitted isolation of the *P. pastoris* X-33EAS (*entA*), *P. pastoris* X-33BE50-52S (*bacE50-52*), *K. lactis* GG799EAS (*entA*), and *K. lactis* GG799BE50-52S (*bacE50-52*) recombinant yeasts. *P. pastoris* X-33EAS and *K. lactis* GG799EAS were selected according to their high antimicrobial activity against *P. damnosus* CECT4797 by the SOAT. However, *P. pastoris* X-33BE50-52S did not show antimicrobial activity against any of the indicator bacteria tested and was selected for its high zeocin resistance (1,000 µg/ml). Similarly, *K. lactis* GG799BE50-52S did not show a direct antimicrobial activity but was also selected for further studies. Colonies of *P. pastoris* X-33 and *K. lactis* GG799, transformed with the linearized control plasmids without inserts were used as bacteriocin-negative controls to discard the possibility that the antimicrobial activity exerted by the recombinant hosts was due to metabolites other than bacteriocins.

The production and functional expression of EntA by *P. pastoris* X-33EAS and *K. lactis* GG799EAS was quantified by specific anti-EntA antibodies in a NCI-ELISA and a microtitre plate assay (MPA), respectively. The largest production of EntA by *P. pastoris* X-33EAS was 21.4-fold higher, its antimicrobial activity was 235-fold higher, and its specific antimicrobial activity was 11-fold higher than that of the EntA from the supernatants of *E. faecium* T136 (**Table 4.3.**). However, the production of EntA by *K. lactis* GG799EAS was 1.2-fold higher but its antimicrobial activity and specific antimicrobial activities were 2.5- to 6.1-times lower than that of the EntA produced by *E. faecium* T136 (**Table 4.3.**).

**Table 4.3.** Production and antimicrobial activity of the EntA from supernatants of *P. pastoris* X-33EAS and *K. lactis* GG799EAS

Strain	Incubation time (h)	OD <sub>600</sub> <sup>a</sup>	EntA production (µg EntA/ml) <sup>b</sup>	Antimicrobial activity (BU/ml) <sup>c</sup>	Specific antimicrobial activity (BU/ µg EntA) <sup>d</sup>
<i>P. pastoris</i> X-33EAS	0	1.0	ND	NA	NE
	2	1.6	1.4	40	28
	4	1.9	6.2	8,372	1,350
	6	3.4	17.2	33,684	1,958
	8	6.5	22.1	43,692	1,970
	10	7.2	24.3	77,418	3,185
	12	8.9	32.1	136,000	4,236
	24	9.0	29.7	70,506	2,374
	36	8.8	28.2	43,715	1,551
	48	9.8	19.2	19,216	1,001
<i>K. lactis</i> GG799EAS	0	1	ND	NA	NE
	2	2	0.3	18	60
	4	4.8	0.6	90	150
	6	6.7	1.0	94	94
	8	8.4	1.8	9	5
	10	8.7	1.7	8	4
	12	10.1	0.4	NA	NE
	24	9.1	ND	NA	NE
	36	9.4	ND	NA	NE
	48	8.5	ND	NA	NE
<i>E. faecium</i> T136 <sup>e</sup>	16	0.9	1.5	577	385

Most of the data are mean from two independent determinations in triplicate.

<sup>a</sup> OD<sub>600</sub>, optical density of the culture at 600 nm.

<sup>b</sup> Production of EntA was calculated by using an NCI-ELISA with polyclonal antibodies specific for EntA. ND, no detected.

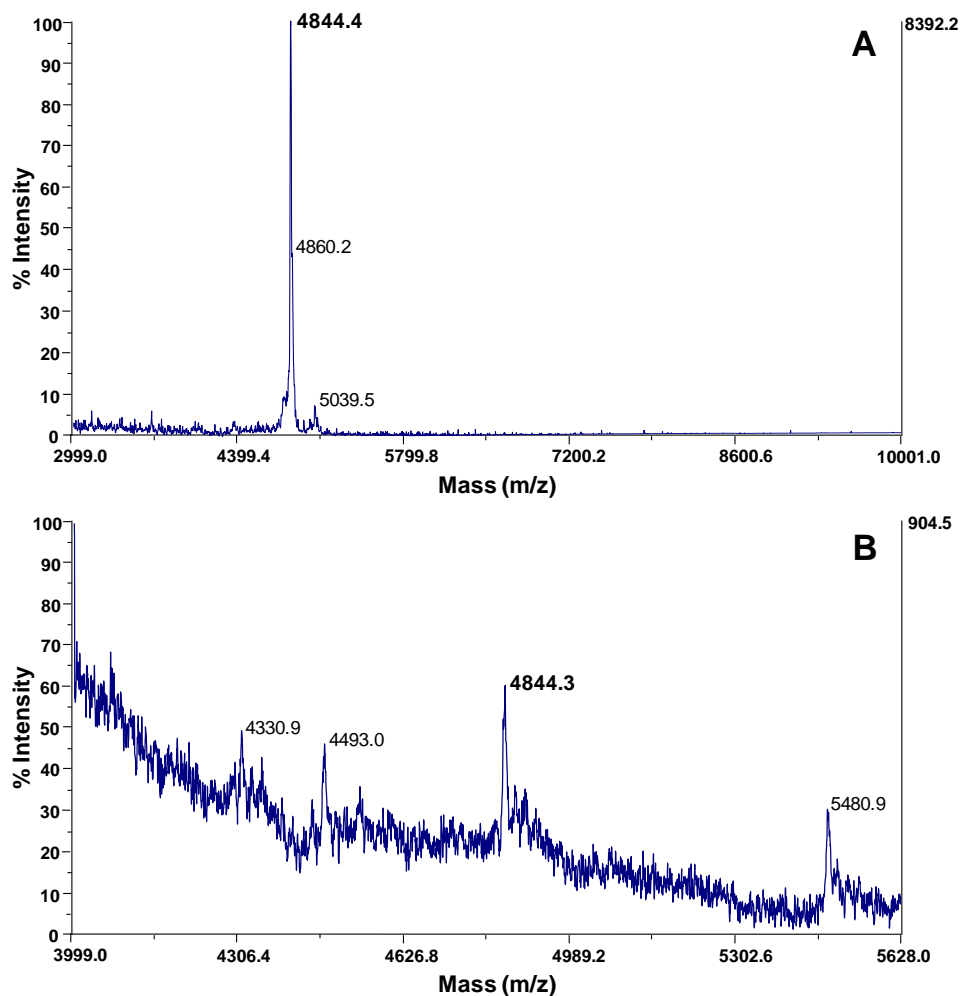
<sup>c</sup> Calculated by MPA against *E. faecium* P13 (EntA<sup>s</sup>). BU, bacteriocin units. NA, no activity.

<sup>d</sup> Calculated as the antimicrobial activity against *E. faecium* P13 divided by the EntA produced. NE, not evaluable.

<sup>e</sup> Cultures of *E. faecium* T136 were used as controls for EntA production and antimicrobial activity.

**4.3.2. Purification of the bacteriocins EntA and BacE50-52, and mass spectrometry analysis.** The EntA produced by *E. faecium* P13, *P. pastoris* X-33EAS and *K. lactis* GG799EAS was purified to homogeneity (results not shown). The BacE50-52, produced by *P. pastoris* X-33BE50-52S and *K. lactis* GG799BE50-52S was also purified although only eluted fractions after the gel filtration step showed antimicrobial activity. Furthermore, purified fractions from the *K. lactis* GG799BE50-52S supernatants showed a higher antimicrobial activity than those from *P. pastoris* X-33BE50-52S (**Table 4.4.**). MALDI-TOF MS analysis of the purified EntA from *P. pastoris* X-33EAS showed a major dominant signal

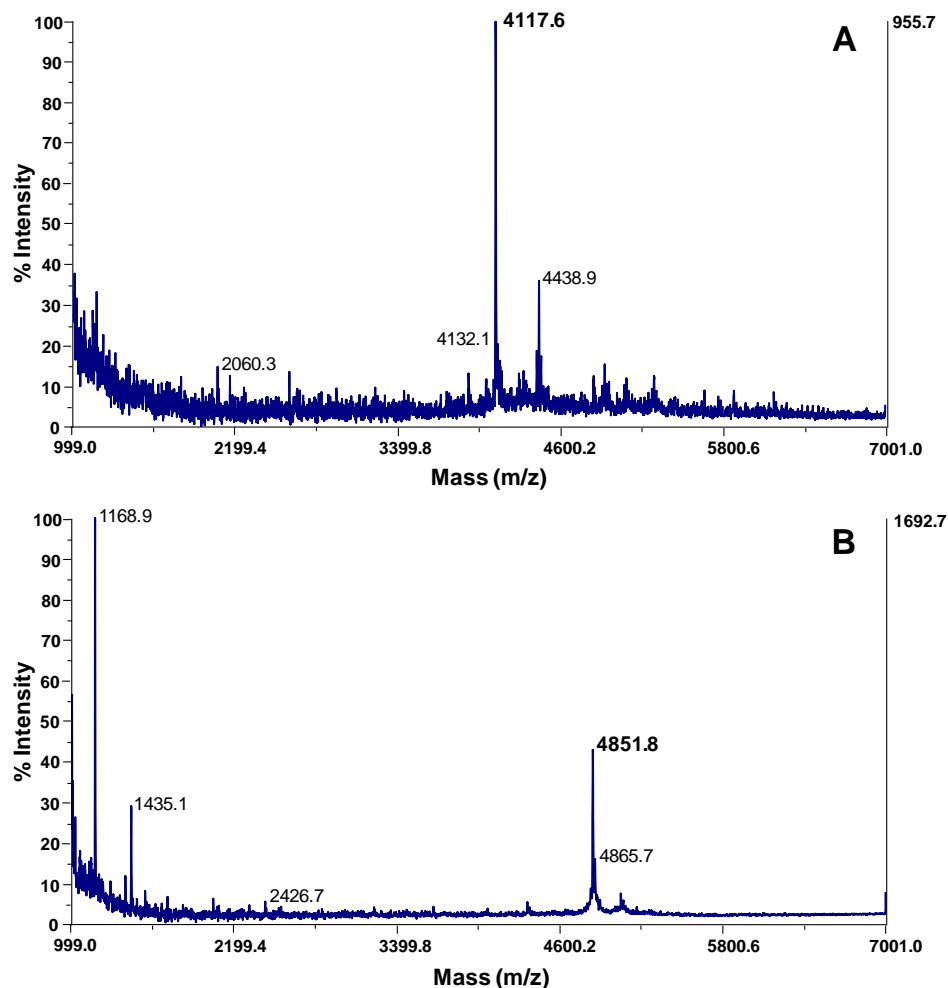
of 4,844.4 Da. However, the EntA purified from *K. lactis* GG799EAS showed a major peptide peak of 4,844.3 Da and peptide fragments of major and minor molecular mass (**Fig. 4.1**). Similarly, MALDI-TOF MS of the purified BacE50-52 produced by *P. pastoris* X-33BE50-52S showed major peaks of 4,117.6 Da and 4,438.9 Da, respectively, while the purified BacE50-52 from *K. lactis* GG799BE50-52S showed a major peptide fragment of 4,851.8 Da (**Fig. 4.2**).



**Figure 4.1.** Mass spectrometry analysis of purified enterocin A from *P. pastoris* X-33EAS (**A**), and *K. lactis* GG799EAS (**B**). Numbers indicate the molecular mass in daltons of most of the observed peptide fragments.

**4.3.3. Antimicrobial activity of the purified EntA and BacE50-52 against *Listeria* spp. and other selected bacteria.** The purified EntA and BacE50-52 were evaluated for their antimicrobial activity against *L. ivanovii*, *L. grayii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. innocua* and six *L. monocytogenes* strains. All purified bacteriocins showed antagonistic activity against *Listeria* spp. The purified EntA produced by *P. pastoris* X-33EAS showed a 3.7- to 603-fold higher antilisterial activity than the EntA purified from *E. faecium* T136, and a 568- to 3,741-fold higher antilisterial activity than the EntA produced by *K. lactis* GG799EAS (**Table 4.5**). The purified BacE50-52 produced by *K. lactis* GG799BE-50-52S showed a 5.7- to 28.1-fold higher antilisterial activity than the BacE50-52 produced by *P. pastoris* X-

33BE50-52S, although their antilisterial activities were 90- to  $3.4 \times 10^4$ -times lower than the purified EntA produced by *P. pastoris* X-33EAS (**Table 4.5.**). However, none of the purified EntA and BacE50-52 bacteriocins showed antimicrobial activity against *S. aureus* 4-03937, *C. perfringens* CECT821, *S. pneumoniae* FQ35, *E. coli* JM109, *S. typhimurium* CECT443, *A. salmonicida* LMG3776, *V. campbellii* LMG21363, *Y. ruckeri* LMG3279, *C. jejuni* ATCC33560, and *C. jejuni* NCTC11168.



**Figure 4.2.** Mass spectrometry analysis of purified bacteriocin E 50-52 from *P. pastoris* X-33E50-52S (A), and *K. lactis* GG799E50-52S (B). Numbers indicate the molecular mass in daltons of most of the observed peptide fragments.

#### 4.4. DISCUSSION

With the emergence of bacterial antibiotic resistance and emerging bacterial pathogens, bacteriocins produced by LAB may find their use as natural antimicrobial peptides in food, medical, veterinary, and animal production applications. However, the high cost of synthetic bacteriocin synthesis, their low yields, and the production of potential virulence factors from many natural producers drive the exploration of microbial systems for the biotechnological production of bacteriocins by heterologous LAB and yeasts (Borrero et 2011b; Borrero et al., 2012).

A number of yeast platforms have been used for the heterologous production of peptides and proteins, including bacteriocins (van Ooyen et al., 2006; Böer et al., 2007; Borrero et al., 2012b). Furthermore, while synthetic genes encoding the bacteriocin divercin RV41 and the hybrid bacteriocin Ent35-MccV have been evaluated for its expression by recombinant bacterial hosts (Richard et al., 2004; Acuña et al., 2012), the use of synthetic bacteriocin genes has not been yet sufficiently explored for their expression by recombinant yeasts. In this work, the pPICZ $\alpha$ A and pKLAC2 protein expression vectors containing the (i) strong and inducible  $P_{AOXI}$  and  $P_{LAC4}$  promoters, respectively, (ii) the *S. cerevisiae* gene region encoding the mating pheromone  $\alpha$ -factor-1 secretion signal (MF $\alpha$ 1<sub>s</sub>) and the Kex2 signal cleavage site for processing of fusion proteins during MF $\alpha$ 1<sub>s</sub>-directed secretion through the Sec-dependent system, and a (iii) host homologous gene which drives the integration of the linearized vectors into the yeast genome stabilizing foreign protein (Cregg et al., 2000; Colussi and Taron, 2005), have been used to drive the expression of synthetic genes encoding the mature bacteriocins EntA and BacE50-52 by recombinant *P. pastoris* X-33 and *K. lactis* GG799 derivatives.

Initial experiences with recombinant *P. pastoris* X-33 and *K. lactis* GG799 determined that yeasts encoding EntA but, not those encoding BacE50-52, showed antimicrobial activity by the SOAT. A number of factors including copy number integration of the protein expression vectors in the yeast DNA, mRNA stability, and coordination of the rates of protein synthesis, folding and translocation of the produced bacteriocin may affect production of foreign peptides by heterologous yeasts (Borrero et al., 2012). The amino acid sequence following the secretion signal and the nature of the cleavage site for processing and secretion by bacterial and yeast Sec-dependent systems, may also interfere with the secretion of fused proteins through membranes (Le Loir et al., 1998). Although EntA holds the TTHSGKY-amino acid sequence before the YGNGVxC consensus sequence of the class IIa bacteriocins, and BacE50-52 holds the TTKN-amino acid sequence before its YGNGVC consensus like-sequence, it may happen that the charged K<sup>+</sup> residue of BacE50-52 limits its processing and secretion out of the recombinant yeast cells. It is known that bacteriocins cloned in *S. cerevisiae* (Schoeman et al., 1999; van Reenen et al., 2002; Basanta et al., 2009), *P. pastoris* (Beaulieu et al., 2005; Gutiérrez et al., 2005; Sánchez et al., 2008; Basanta et al., 2010; Borrero et al., 2012), and *K. lactis*, *Hansenula polymorpha* and *Arxula adeninivorans* (Borrero et al., 2012) have been produced by these recombinant yeasts with variable success regarding its secretion and functional expression.



**Table 4.4.** Antimicrobial activity of fractions generated during purification of the BacE50-52 produced by the recombinant *P. pastoris* X-33 and *K. lactis* GG799 derivatives

Strain	Antimicrobial activity (BU/ml) of the purified fractions <sup>a</sup>					
	SN	AS	GF	SE	OE	RP-FPLC
<i>Pichia pastoris</i>						
X-33BE50-52S	NA	NA	35,680	9,643	173,453	316,977
<i>Kluyveromyces lactis</i>						
GG799BE50-52S	NA	NA	74,568	40,211	174,682	714,621

Most of the data are mean from two independent determinations in triplicate

<sup>a</sup> Antimicrobial activity against *P. damnosus* CECT4797. BU, bacteriocin units. NA, no activity. Purification fraction abbreviations as: SN, supernatant; AS, ammonium sulfate precipitation; GF, gel filtration; SE, Sepharose fast flow eluate; OE, octyl Sepharose eluate; RP-FPLC, reversed-phase eluate.

In this work, the production of EntA by *P. pastoris* X-33EAS was 21.4-fold higher than by *E. faecium* T136. However, the production of EntA by *K. lactis* GG799EAS was lower than expected (**Table 4.3.**). The different production of EntA by recombinant *P. pastoris* X-33 and *K. lactis* GG799 may be due to promoter differences, to the dosages of *entA* in their genomes, and/or to differences in the genetic backgrounds of the two strains. The decrease of EntA in the supernatants of *P. pastoris* X-33EAS and *K. lactis* GG799EAS during induction and growth in their production medium may be ascribed to, among other factors, the attachment of EntA to cell walls, the formation of aggregates, and/or to subtle proteolytic degradation (Borrero et al., 2012). The antimicrobial activity of the EntA produced by *P. pastoris* X-33EAS was 235-fold higher and its specific antimicrobial activity 11-fold higher than the produced by *E. faecium* T136. However, the antimicrobial activity and the specific antimicrobial activity of the EntA produced by *K. lactis* GG799EAS was 2.5 to 6.1-times lower, respectively, than the EntA produced by *E. faecium* T136 (**Table 4.3.**).

Recombinant *P. pastoris* X-33 encoding the synthetic mature *entA* with the codon usage for expression by *P. pastoris*, as shown in this work, or encoding the mature *entA* from *E. faecium* T136 (Borrero et al., 2012), secrete in their supernatants a 21.4- to 30-fold higher amounts of EntA with a 235- to 430-fold higher antimicrobial activity and a 11- to 14-fold higher specific antimicrobial activity than the EntA produced by *E. faecium* T136. Slightly higher amounts of EntA of higher antimicrobial activity were produced by recombinant *P. pastoris* encoding the *entA* from *E. faecium* T136 than the synthetic *entA* used in this work. Thus, although gene sequences with the preferred codon usage of the producer cells can lead to increases in protein synthesis, other factors such as *entA* copy number and/or yeast growth rates may affect the amount and antimicrobial activity of the produced EntA. Recombinant LAB, heterologous producers of EntA, also show a higher production of EntA (1.5- to 18.5-fold) and a higher antimicrobial activity (1.5- to 6.6-fold) than that of *E. faecium* T136, but the specific antimicrobial activity of the secreted EntA is lower than deduced from its production (Martín et al., 2007a; Borrero et al., 2011b). Other recombinant LAB, heterologous producers of enterocin P (EntP), hiracin JM78 (HirJM79) and pediocin PA-1 (PedA-1) also showed a higher production and antimicrobial activity of these bacteriocins although their specific antimicrobial activities differed from that produced by the original LAB producers Gutiérrez et al., 2006; Martín et al., 2007b; Sánchez et al., 2008; Borrero et al., 2011a). Accordingly, *P. pastoris* X-33EAS and *P. pastoris* X-33EA, overproducers of EntA and with higher antimicrobial and specific antimicrobial activities than the EntA produced by *E. faecium* T136, would be considered as appropriate cell factories and an alternative to LAB for production of EntA of higher antimicrobial and specific antimicrobial activities, providing a means by which the potential benefits of this bacteriocin could be exploited in diverse biotechnological applications.

The bacteriocins produced by recombinant *P. pastoris* X-33 and *K. lactis* GG799 were also purified to homogeneity. All purified fractions from yeasts producing EntA showed antagonistic activity (results not shown) while antimicrobial activity was only observed after purification of the supernatants of *P. pastoris* X-33BE50-52S and *K. lactis* GG700BE50-52S, encoding *bacE50-52*, by gel filtration (**Table 4.4.**). While interesting, this was not an

unexpected observation since purification of the circular garvicin ML, produced by *Lactococcus garvieae* DCC43, showed a higher antibacterial activity and a broader antimicrobial spectrum as it was increasingly purified (Borrero et al., 2011c). MALDI-TOF MS analysis of the EntA produced by *P. pastoris* X-33EAS showed a major peptide fraction of identical molecular mass (4,844.4 Da) than the EntA produced by *E. faecium* T136 (Borrero et al., 2011b). The peptide fragment of 4,860.2 Da may correspond to oxidation (+16 Da) of the methionine residue (Met<sup>33</sup>) of the EntA to methionine sulfoxide (MetSO) (**Fig. 4.1.**). The oxidation of methionine residues during production and purification of EntA by recombinant LAB is common (Martín et al., 2007a; Borrero et al., 2011b). However, the purified EntA from *K. lactis* GG799EAS gave not only a peptide fragment with a molecular mass (4,844.3 Da) identical to the EntA produced by *E. faecium* T136, but also other peptide fragments of minor (4,330.9 Da; 4,993.0 Da) and major (5,480.9 Da) molecular mass (**Fig. 4.1.**). It is possible that synthetic *entA*, cloned in *K. lactis* GG799EAS, may produce incorrectly folded EntA thus affecting the processing, transport and functional expression of the synthesized EntA (Gasser et al., 2008). The lower production of EntA by *K. lactis* GG799EAS and the presence of purified peptide fragments of different molecular mass, may also suggest the existence of truncated EntA fractions, the interaction of the bacteriocin with unknown biological compounds (Beaulieu et al., 2005) or the EntA being subject to post-translational modifications (PTM). The presence of four cysteine residues and one methionine residue in the EntA would permit the formation of correct disulfide bridges but also the oxidation of these residues and the covalent attachment of different compounds to cysteine. Cysteine is susceptible to chemical modifications such as glutathionylation and cysteinylation. Glycosylation is also a common post-translational modification in eukaryotes involving linkage via the N-X-S/T amino acid sequence (N-glycosylation) or the side chain of serine and threonine (O-glycosylation) (Zhao and Jensen, 2009). The absence in EntA of attachment sites for N-linkages precludes their N-glycosylation, but the presence of six threonines and two serines makes the EntA suitable for O-glycosylation.

MALDI-TOF MS analysis of the purified BacE50-52, produced by *P. pastoris* X-33BE50-52, showed a major peptide fragment of 4,117.6 Da, identical to the theoretical 4,125.7 Da molecular mass of mature BacE50-52 assuming the existence of three disulfide bonds linking the six cysteine residues of its amino acid sequence. However, the presence of peptide sequences of higher (4,438.9 Da) molecular mass was also observed. On the other hand, the purified BacE50-52, produced by *K. lactis* GG799BE50-52, showed a peptide fragment of a higher molecular mass (4,851.8 Da) than expected for mature BacE50-52 (**Fig. 4.2.**). The presence of six cysteine residues in BacE50-52 would facilitate the formation of correct disulfide bridges but also permit its oxidation, glutathionylation and cysteinylation. The absence in BacE50-52 of attachment sites for N-linkages precludes its N-glycosylation, but the presence of three threonines and two serines make the bacteriocin sensitive to O-glycosylation.

**Table 4.5.** Antimicrobial activity<sup>a</sup> of the purified EntA and BacE50-52 produced by the recombinant *P. pastoris* X-33 and *K. lactis* GG799 derivatives against *Listeria* spp.<sup>b</sup>

Strain	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. grayii</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>					
	913	931	919	917	910	911	935	936	939	4031	4032
<i>Pichia pastoris</i>											
X-33EAS	2,027,800	103,900	134,300	1,405,600	48,330	122,800	35,500	195,000	493,000	371,200	204,700
X-33BE50-52S	58	41	41	75	8	8	8	33	41	33	16
<i>Kluyveromyces lactis</i>											
GG799EAS	542	86	114	271	42	71	42	343	503	343	171
GG799BE50-52S	1,312	1,156	935	980	213	176	149	441	236	435	237
<i>Enterococcus faecium</i>											
T136 <sup>c</sup>	185,400	27,550	4,940	2,330	2,760	640	410	5,030	3,130	4,380	8,940

Most of the data are mean from two independent determinations in triplicate.

<sup>a</sup> Antimicrobial activity in BU/μg purified bacteriocin (EntA or BacE50-52). NA, no activity.

<sup>b</sup> All *Listeria* spp. were obtained from the CECT (Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia, Spain).

<sup>c</sup> Culture of *E. faecium* T136 used as control for the antimicrobial activity of its purified EntA.

The purified EntA and BacE50-52 showed antimicrobial activity against *Listeria* spp. with purified EntA, produced by *P. pastoris* X-33EAS, as the most active antilisterial bacteriocin (**Table 4.5.**). It has been speculated that the lower specific antimicrobial activity of bacteriocins produced by heterologous LAB may be due, among other factors, to deficiencies in disulfide bond (DSB) formation, a conserved mechanism for stabilizing extracytoplasmic proteins carried out by thiol-disulfide reductases (Borrero et al., 2012). The EntA has two DSB that appears to improve its antimicrobial activity ((Eijsink et al., 1998). However, an advantage of yeasts over bacterial systems is that yeasts may perform posttranslational modifications, such as DSB formation and protein folding, more efficiently (Zerbs et al., 2009). The highest antilisterial activity of the purified EntA, produced by *P. pastoris* X-33EAS, as compared to that of the EntA produced by *K. lactis* GG799EAS and *E. faecium* T136, further reinforces the role of this recombinant yeast as a potential cell factory for the heterologous overproduction, recovery, and purification of EntA as a natural antimicrobial agent in potential food, medical, veterinary, and animal production applications. The lower antilisterial activity of the EntA purified from *K. lactis* GG799EAS could be ascribed to its lower production by the recombinant yeast (**Table 4.3.**), the existence of truncated bacteriocin forms, and the existence of posttranslational modifications that would be the subject of future investigations (**Fig. 4.1.**).

The antilisterial activity of the purified BacE50-52, produced by *K. lactis* GG799BE50-52S, was 5.7- to 28.1-fold higher than that produced by *P. pastoris* X-33BE50-52S, but 90- to 1,545-times lower than the antilisterial activity of the EntA produced by *P. pastoris* X-33EAS (**Table 4.5.**). Differences in susceptibility of *L. monocytogenes* strains to class IIa bacteriocins has been previously noted (Katla et al., 2003). But in order to be active, bacteriocins need to recognize a target molecule at the surface of sensitive cells, and the target receptor for class IIa or pediocin-like bacteriocins has been identified as proteins of the sugar transporter mannose phosphotransferase system (Man-PTS) (Diep et al., 2007; Kjos et al., 2011). Interestingly, Man-PTS are not found in eukaryotes. Moreover, class IIa bacteriocins seem to target specifically a phylogenetically defined subgroup of Man-PTS that exclusively contain members of the Gram-positive Firmicutes with the most potent receptors being those found in *Listeria* spp. and *Enterococcus* spp. (Kjos et al., 2011). However, misfolding of secreted bacteriocins and extensive PTMs may be responsible of the lower antilisterial activity of the EntA produced by *K. lactis* GG799EAS, and the BacE50-52 produced by *P. pastoris* X-33BE50-52S and *K. lactis* GG799BE50-52S.

However, none of the purified EntA and BacE50-52 showed antimicrobial activity against *S. aureus* 4-03937, *C. perfringens* CECT821, *S. pneumoniae* FQ35, *E. coli* JM109, *S. typhimurium* CECT443, *A. salmonicida* LMG3776, *V. campbellii* LMG21363, *Y. ruckeri* LMG3279, *C. jejuni* ATCC33560, and *C. jejuni* NCTC11168. While the EntA produced by *E. faecium* strains of diverse origins shows a high antilisterial activity with no activity against Gram-positive bacteria (Aymerich et al., 1996; Sánchez et al., 2007), the BacE50-52 produced by *E. faecium* B-30746 showed antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, including *Campylobacter* spp. (Svetoch et al., 2008a, b). It has been also reported that purified BacE50-52 from *E. faecium* B-30746 showed a molecular mass of

3,339.7 Da which is in contrast with its predicted molecular mass of 4,125 Da (Svetoch et al., 2008a). However, the purified BacE50-52 from *P. pastoris* X-33BE50-52S and *K. lactis* GG799BE50-52S did not show a peptide fragment of the molecular mass as that produced by *E. faecium* B-30746. It may happen that still unknown modifications of purified BacE50-52 and the presence of non-reported synergistic compounds or specialized outer membrane transporters, would be required for BacE50-52 to reach sensitive Gram-negative bacterial receptors. Uncorrect disulfide bond formation, misfolding of the secreted bacteriocin and extensive PTMs, may be also responsible for the low antimicrobial activity of the purified BacE50-52 against the evaluated Gram-negative bacteria.

As reported in this study, *P. pastoris* X-33EAS producer of EntA from a codon usage adapted synthetic mature *entA* significantly increases the production, antimicrobial activity, and specific antimicrobial activity of EntA in the absence of dedicated immunity and secretion proteins, as compared to that of recombinant LAB heterologous producers of EntA from PCR-amplified *entA* encoded by enterococci. These results also contrast with the lower production and antimicrobial activity of the EntA produced by *K. lactis* GG799EAS, and with the low antimicrobial activity of the BacE50-52, produced by *P. pastoris* X-33BE50-52S and *K. lactis* GG799BE50-52S. Moreover, since the effectiveness of yeast expression systems for production, recovery, and functional expression of bacteriocins from synthetic bacteriocin genes is difficult to predict, further efforts should be performed for a more efficient genetically engineered production and functional expression of other synthetic bacteriocin genes, their quimeras or hybrid antimicrobial peptides by heterologous producer yeasts.

## 4.5. ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially supported by projects AGL2012-34829 from the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) and AGL2009-08348 from the Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN), by project GR35-10A from the Banco de Santander Central Hispano-Universidad Complutense de Madrid (BSCH-UCM), and by project S2009/AGR-1489 from the Comunidad de Madrid (CAM). J.J. Jiménez and S. Arbulu are recipient of fellowships (FPI) from the MICINN. J. Borrero held a research contract from the CAM, and L. Gútiez holds a fellowship (FPU) from the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC), Spain.

## 4.6. REFERENCES

- Acuña, L., Picariello, G., Sesma, F., Morero, R.D. and Bellomio, A. (2012). A new hybrid bacteriocin, Ent35-MccV, displays antimicrobial activity against pathogenic Gram-positive and Gram-negative bacteria. *FEBS. Open Bio.* 2:12-19.
- Aymerich, T., Holo, H., Håvarstein, L.S., Hugas, M., Garriga, M. and Nes, I.F. (1996). Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin-family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1676-1682.

- Basanta, A., Gómez-Sala, B., Sánchez, J., Dzung, B.D., Herranz, C., Hernández, P.E. and Cintas, L.M. (2010). Use of the yeast *Pichia pastoris* as an expression host for secretion of enterocin L50, a leaderless two-peptide (L50A and L50B) bacteriocin from *Enterococcus faecium* L50. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:3314-3324.
- Basanta, A., Herranz, C., Gutiérrez, J., Criado, R., Hernández, P.E. and Cintas, L.M. (2009). Development of bacteriocinogenic strains of *Saccharomyces cerevisiae* heterologously expressing and secreting the leaderless enterocin L50 peptides L50A and L50B from *Enterococcus faecium* L50. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:2382-2392.
- Beaulieu, L., Groleau, D., Míguez, C.B., Jetté, J.F., Aomari, H. and Subirade, M. (2005). Production of pediocin PA-1 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* reveals unexpected inhibition of its biological activity due to the presence of collagen-like material. *Prot. Expr. Purif.* 43:111-125.
- Böer, E., Steinborn, G., Kunze, G. and Gellissen, G. (2007). Yeast expression platforms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77:513-523.
- Borrero, J., Brede, D.A., Skaugen, M., Diep, D.B., Herranz, C., Nes, I.F., Cintas, L.M. and Hernández, P.E. (2011c). Characterization of garvicin ML, a novel circular bacteriocin produced by *Lactococcus garvieae* DCC43, isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Appl. Environ. Microbiol.* 77:369-373.
- Borrero, J., Jiménez, J.J., Gútiérrez, L., Herranz, C., Cintas, L.M. and Hernández, P.E. (2011a). Use of the *usp45* lactococcal secretion sequence signal sequence to drive the secretion and functional expression of enterococcal bacteriocins in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89:131-143.
- Borrero, J., Jiménez, J.J., Gútiérrez, L., Herranz, C., Cintas, L.M. and Hernández, P.E. (2011b). Protein expression vector and secretion signal peptide optimization to drive the production, secretion, and functional expression of the bacteriocin enterocin A in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* 156:76-86.
- Borrero, J., Kunze, G., Jiménez, J.J., Böer, E., Gútiérrez, L., Herranz, C., Cintas, L.M. and Hernández, P.E. (2012). Cloning, production and functional expression of the bacteriocin enterocin A, produced by *Enterococcus faecium* T136, by the yeasts *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha* and *Arxula adeninivorans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:5956-5961.
- Casaus, P., Nilsen, T., Cintas, L.M., Nes, I.F., Hernández, P.E. and Holo, H. (1997). Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiol.* 143:2287-2294.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Håvarstein, L.S., Hernández, P.E. and Nes, I.F. (1997). Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel *sec*-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4321-4330.
- Colussi, P.A. and Taron, C.H. (2005). *Kluyveromyces lactis* LAC4 promoter variants that lack function in bacteria but retain full function in *K. lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:7092-7098.
- Cotter, P.D., Hill, C. and Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:777-788.

- Cregg, J.M., Cereghino, J.L., Shi, J. and Higgins, D.R. (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.* 16:23-52.
- Denis-Quanquin, S., Lamouroux, L., Lougarre, A., Mahéo, S., Saves, I., Paquereau, L., Demange, P. and Fournier, D. (2007). Protein expression from synthetic genes: selection of clones using GFP. *J. Biotechnol.* 131:223-230.
- Diep, D.B., Skaugen, M., Salehian, Z., Holo, H. and Nes, I.F. (2007.) Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:2384-2389.
- Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L.M. and Prévost, H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70:564-582.
- Eijsink, V.G.H., Skeie, M., Middelhoven, P.H., Brurberg, M.B. and Nes, I.F. (1998). Comparative studies of class II bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3275-3281.
- Franz, C.M., van Belkum, M.J., Holzapfel, W.H., Abriouel, H. and Gálvez, A. (2007). Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS. Microbiol. Rev.* 31:293-310.
- Gao, Z., Li, Z., Zhang, Y., Huang, H., Li, M., Zhou, L., Tang, Y., Yao, B. and Zhang, W. (2012). High-level expression of the *Penicillium notatum* glucose oxidase gene in *Pichia pastoris* using codon usage optimization. *Biotechnol. Lett.* 34:507-514.
- Gasser, B., Saloheimo, M., Rinas, U., Dragosits, M., Rodríguez-Carmona, E., Baumann, K., Giuliani, M., Parrilli, E., Branduardi, P., Lang, C., Porro, D., Ferrer, P., Tutino, M.L., Mattanovich, D. and Villaverde, A. (2008). Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview. *Microb. Cell. Fact.* 4:7-11.
- Gutiérrez, J., Criado, R., Martín, M., Herranz, C., Cintas, L.M. and Hernández, P.E. (2005). Production of enterocin P, an antilisterial pediocin-like bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13, in *Pichia pastoris*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 49:3004-3008.
- Gutiérrez, J., Larsen, R., Cintas, L.M., Kok, J. and Hernández, P.E. (2006). High-level heterologous production and functional expression of the *sec*-dependent enterocin P from *Enterococcus faecium* P13 in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72:41-51.
- Hoang, K.V., Stern, N.J. and Lin, J. (2011). Development and stability of bacteriocin resistance in *Campylobacter* spp. *J. Appl. Microbiol.* 111:1544-1550.
- Katla, T., Naterstad, K., Vancanneyt, M., Swings, J. and Axelsson, L. (2003). Differences in susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to sakacin P, sakacin A, pediocin PA-1, and nisin. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4431-4437.
- Kjos, M., Borrero, J., Opsata, M., Birri, D.J., Holo, H., Cintas, L.M., Snipen, L., Hernández, P.E., Nes, I.F. and Diep, D.B. (2011). Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Microbiol.* 157:3256-3267.
- Le Loir, Y., Gruss, A., Ehrlich, D. and Langella, P. (1998). A nine-residue synthetic propeptide enhances secretion efficiency of heterologous proteins in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 180:1895-1903.



- Martín, M., Gutiérrez, J., Criado, R., Herranz, C., Cintas, L.M. and Hernández, P.E. (2007a). Chimeras of mature pediocin PA-1 fused to the signal peptide of enterocin P permits the cloning, production, and expression of pediocin PA-1 in *Lactococcus lactis*. *J. Food. Prot.* 70:2792-2798.
- Martín, M., Gutiérrez, J., Criado, R., Herranz, C., Cintas, L.M. and Hernández, P.E. (2007b). Cloning, production and expression of the bacteriocin enterocin A produced by *Enterococcus faecium* PLBC21 in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76:667-675.
- Messaoudi, S., Kergourlay, G., Dalgarrondo, M., Choiset, Y., Ferchichi, M., Prevost, H., Pilet, M-F., Chobert, J-M., Manai, M. and Dousset, X. (2012). Purification and characterization of a new bacteriocin active against *Campylobacter* produced by *Lactobacillus salivarius* SMXD51. *Food Microbiol.* 32:129-134.
- Montalbán-López, M., Sánchez-Hidalgo, M., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M. and Maqueda, M. (2011). Are bacteriocins underexploited? Novel applications for old antimicrobials. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 12:1205-1220.
- Nes, I.F., Yoon, S.S. and Diep, D.B. (2007). Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: A review. *Food Sci. Biotechnol.* 16:675-690.
- Nilsen, T., Nes, I.F. and Holo, H. (1998). An exported inducer regulates bacteriocin production in *Enterococcus faecium* CTC492. *J. Bacteriol.* 180:1848-1854.
- O'Keefe, T., Hill, C. and Ross, R.P. (1999). Characterization and heterologous expression of the genes encoding enterocin A production, immunity and regulation in *Enterococcus faecium* DPC1146. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1506-1515.
- Öberg, F., Sjöman, J., Conner, M.T., Bill, R.M. and Hedfalk, K. (2011). Improving recombinant eukaryotic membrane protein yields in *Pichia pastoris*: The importance of codon optimization and clone selection. *Mol. Membr. Biol.* 28:398-411.
- Richard, C., Drider, D., Elmorjani, K., Marion, D. and Prevost, H. (2004). Heterologous expression and purification of active divercin V41, a class IIa bacteriocin encoded by a synthetic gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186:4276-4284.
- Sánchez, J., Borrero, J., Gómez-Sala, B., Basanta, A., Herranz, C., Cintas, L.M. and Hernández, P.E. (2008). Cloning and heterologous production of hiracin JM79, a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae*, in lactic acid bacteria and *Pichia pastoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:2471-2479.
- Sánchez, J., Diep, D.B., Herranz, C., Nes, I.F., Cintas, L.M. and Hernández, P.E. (2007). Amino acid and nucleotide sequence, adjacent genes, and heterologous expression of hiracin JM79, a Sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *FEMS. Microbiol. Lett.* 270:227-236.
- Schoeman, H., Vivier, M.A., du Toit, M., Dicks, L.M.T. and Pretorius, I.S. (1999). The development of bactericidal yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (*pedA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15:647-656.
- Svetoch, E.A. and Stern, N.J. (2010). Bacteriocins to control *Campylobacter* spp. in poultry-a review. *Poult. Sci.* 89:1763-1768.
- Svetoch, E.A., Eruslanov, B.V., Kovalev, Y.N., Mitsevich, E.V., Mitsevich, I.P., Levchuck, V.P., Fursova, N.K., Perlygin, V.V., Stepanshin, Y.G., Teymurasov, M.G., Seal, B.S. and Stern, N.J. (2009). Antimicrobial activities of bacteriocins E 50-52 and B 602

- against antibiotic-resistant strains involved in nosocomial infections. *Probiotics Antimicrob. Prot.* 1:136-142.
- Svetoch, E.A., Eruslanov, B.V., Perelygin, V.V., Mitsevich, E.V., Mitsevich, I.P., Borzenkov, V.N., Levchuk, V.P., Svetoch, O.E., Kovalev, Y.N., Stepanshin, Y.G., Siragusa, G.R., Seal, B.S. and Stern, N.J. (2008a). Diverse antimicrobial killing by *Enterococcus faecium* E 50-52 bacteriocin. *J. Agric. Food Chem.* 56:1942-1948.
- Svetoch, E.A., Levchuk, V.P., Pokhilenko, V.D., Eruslanov, B.V., Mitsevich, E.V., Mitsevich, I.P., Perelygin, V.V., Stepanshin, Y.G. and Stern, N.J. (2008b). Inactivating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other pathogens by use of bacteriocins OR-7 and E 50-52. *J. Clin. Microbiol.* 46:3863-3865.
- van Ooyen, A.J.J., Dekker, P., Huang, M., Olsthoorn, M.M.A., Jacobs, D.I., Colussi, P.A. and Taron, C.H. (2006). Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res.* 6:381-392.
- van Reenen, C.A., Chikindas, M.L., van Zyl, W.H. and Dicks, L.M.T. (2002). Characterization and heterologous expression of a class IIa bacteriocin, plantaricin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 81:29-40.
- Ward, N.J., Buckley, S.M., Waddington, S.N., Van den Driesche, T., Chuah, M.K., Nathwani, A.C., McIntosh, J., Tuddenham, E.G., Kinnon, C., Thraser, J. and McVey, J.H. (2011). Codon optimization of human factor VIII cDNAs leads to high level expression. *Blood* 117:798-80.
- Zerbs, S., Frank, A.M. and Collart, F.R. (2009). Bacterial systems for production of heterologous proteins. *Methods Enzymol.* 463:149-168.
- Zhao, Y. and Jensen, O.N. (2009). Modification-specific proteomics: strategies for characterization of post-translational modifications using enrichment techniques. *Proteomics* 9:4632-4641.



# CAPÍTULO / CHAPTER 5

**Sustitución de la secuencia líder y evaluación de diferentes vectores para la producción heteróloga de la bacteriocina enterocina A por *Lactobacillus sakei* Lb790, *Lactobacillus plantarum* NC8 y *Lactobacillus casei* CECT475**

---

**Replacement of the leader sequence and evaluation of different vectors for heterologous expression of the bacteriocin enterocin A by *Lactobacillus sakei* Lb790, *Lactobacillus plantarum* NC8 and *Lactobacillus casei* CECT475**



## ABSTRACT

Replacement of the leader sequence of the bacteriocin enterocin A (LS<sub>entA</sub>) by the signal peptide of the lactococcal protein Usp45 (SP<sub>usp45</sub>) and cloning of quimeras of the SP<sub>usp45</sub> fused to mature EntA plus the EntA immunity gene (*entA* + *entiA*) (UAI) into the protein expression vectors pSIP409 and pSIP411, under control of inducible promoters, and in pMG36c under control of a constitutive promoter, permitted construction of the plasmid-derived vectors pSIP409UAI, pSIP411UAI and pMGUAI, respectively. The amount, antimicrobial activity (AA), and specific antimicrobial activity (SAA) of the EntA produced by *Lactobacillus sakei* Lb790, *Lactobacillus plantarum* NC8 and *Lactobacillus casei* CECT475, transformed with pSIP409UAI, pSIP411UAI and pMGUAI varied depending of the expression vector and the host strain. Supernatants from *Lb. sakei* Lb790 (pSIP411UAI) showed a 2.7-fold higher production of EntA with a 2.2-fold higher AA and 1.2-times lower SAA whereas those from *Lb. casei* CECT (pSIP411UAI) showed a 4.9-fold higher production of EntA with a 22.8-fold higher AA and 4.7-fold higher SAA than those of *Enterococcus faecium* T136, natural producer of EntA. Supernatants from *Lb. sakei* Lb790 (pSIP411UAI) showed a 3.8-times lower to 2.7-fold higher AA against different *Listeria* spp. However, supernatants from *Lb. casei* CECT475 (pSIP411UAI) showed a 15.7- to 59.2-fold higher AA against *Listeria* spp., than those from *E. faecium* T136. *Lb. casei* CECT475 (pSIP411UAI), overproducer of EntA of high AA and SAA would be considered a promising recombinant host for production and functional expression of the antilisterial bacteriocin EntA.

**Keywords:** Bacteriocins; Enterocin A; Lactic acid bacteria (LAB); Expression systems; *Lactobacillus* spp.; Heterologous bacteriocin production.



## 5.1. INTRODUCTION

Within the lactic acid bacteria (LAB) the lactobacilli are increasingly used as starter cultures for food preservation and as probiotics (Karlskås et al., 2014). Furthermore, the lactobacilli are natural inhabitants of the gastrointestinal (GI) tract and attractive vectors for delivery of therapeutic peptides and proteins and production of bioactive peptides (Hazerbrouck et al., 2006; Sah et al., 2014). Probiotics could enhance intestinal barrier function, display immunomodulatory activity and exert protective effects against pathogens due to production of antimicrobial compounds (Corr et al., 2009; van Hemert et al., 2010; Riboulet-Bisson et al., 2012). Production of bacteriocins could contribute to the probiotic functionality of lactobacilli and the *in situ* production of an anti-listerial Abp118 bacteriocin is a major cause of the well-documented probiotic effect of *Lb. salivarius* UCC118 against *Listeria monocytogenes* EFDe infections in mice (Corr et al., 2007; Dobson et al., 2012).

Bacteriocins are ribosomally synthesized antimicrobial peptides secreted by bacteria, and those produced by LAB attract considerable interest as natural and nontoxic food preservatives, for human and veterinary applications, and in the animal production field (Borrero et al., 2011a; Jiménez et al., 2013). Most bacteriocins, including those produced by enterococci named enterocins, are synthesized as biologically inactive precursors or prepeptides containing an N-terminal extension of the so-called double-glycine type (leader sequence) that is cleaved concomitantly with export across the cytoplasmic membrane by dedicated ATP-binding cassette transporters (ABC transporters) and their accessory proteins (Håvarstein et al., 1995). However, many secreted prokaryotic proteins and a few bacteriocins contain N-terminal extensions of the so-called Sec type (signal peptide) which are proteolytically cleaved concomitantly with peptide externalization by the general secretory pathway (GSP) or Sec-dependent pathway (Natale et al., 2008). And the signal peptide (SP) of secretory proteins and bacteriocins may drive the access of fused mature bacteriocins to SPs for their secretion by recombinant LAB producer cells (Borrero et al., 2011a; Borrero et al., 2011b; Jiménez et al., 2013). The mature bacteriocins are often cationic, amphiphilic molecules of 20-60 amino acid residues that are classified into two main classes: the lantibiotics or class I that consist of modified bacteriocins and the class II or nonmodified bacteriocins which are further subdivided in class IIa, class IIb, class IIc, and class IId. The class IIa are the pediocin-like, strong antilisterial bacteriocins (Nes et al., 2007). Additional subgroups have been suggested for leaderless peptides, circular bacteriocins, linear peptides derived from large proteins, and the glycosylated bacteriocins (Kjos et al., 2011).

Accordingly, bacteriocins with high antimicrobial activity against bacterial pathogens could be overproduced and contribute to the probiotic effect (Dobson et al., 2012; Cotter et al., 2013) of recombinant *Lactobacillus* spp. strains. The enterocin A (EntA) is a class IIa bacteriocin whose synthesis is directed by the *entAIFKRTD* operon and from which *entA* encodes the enterocin A prepeptide synthesized as an 18 amino acid leader sequence and the 47 amino acid mature bacteriocin (O'Keefe et al., 1999; Nilsen et al., 2007; ). Moreover, its potent antilisterial activity has driven interest for its overproduction by LAB, mostly of the



genera *Lactococcus*, *Enterococcus* and *Pediococcus* (Martín et al., 2007; Borrero et al., 2011b) and also by yeasts from the genera *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Hansenula* and *Arxula* throughout fusions of mature EntA to signal peptides (SPs) that act as secretion signals (Borrero et al., 2012; Jiménez et al., 2014). Accordingly, of biotechnological interest would be the design and construction of recombinant *Lactobacillus* spp. for the controlled or constitutive heterologous production of bacteriocins with high antimicrobial activity against *Listeria* spp.

In this work, *Lb. sakei* Lb790 a non-bacteriocin producing strain from meat origin (Schillinger and Lücke, 1989), *Lb. plantarum* NC8 from grass silage encoding the two-peptide plantaricins PlnEF, PlnJK and PLNC8 of narrow inhibitory spectra (Diep et al., 2009a; Maldonado-Barragán et al., 2009) and *Lb. casei* CECT475, a reported non-bacteriocin producer from dairy origin, were transformed with derivatives of the inducible protein expression vectors pSIP409 and pSIP411 and the constitutive pMG36c expression vector, all encoding the SP<sub>usp45</sub>-mature *entA* + *entiA* (fragment UAI) and named pSIP409UAI, pSIP411UAI and pMGUAI, respectively, for evaluation of the production of EntA and its functional expression against *Listeria* spp.

## 5.2. MATERIALS AND METHODS

**5.2.1. Microbial strains, plasmids, and growth conditions.** The microbial strains and plasmids used in this study are listed in **Table 5.1**. *Enterococcus faecium* T136 was used as the source of *entA* (EntA) and *entiA* (EntI), whereas *Lactococcus lactis* MG1363 was used as the source of the signal peptide from protein Usp45 (SP<sub>usp45</sub>). The lactococcal strains were propagated at 32°C in M17 broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) supplemented with 0.5% (w/v) glucose (GM17). The enterococcal strains and the lactobacilli were grown in MRS broth (Oxoid) at 32°C. *Escherichia coli* XL10 Gold (Stratagene, La Jolla, CA, USA) was grown in BHI (Oxoid) broth at 37°C with shaking. *Listeria* spp. strains were cultured in BHI broth (Oxoid) at 32°C. Agar plates were made by addition of 1.5% (w/v) agar (Oxoid) to the liquid media. When necessary, chloramphenicol (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) was added at 10 µg ml<sup>-1</sup> for *E. coli*, lactococci and lactobacilli. Erythromycin (Sigma) was added at 350 µg ml<sup>-1</sup> for *E. coli* and at 10 µg ml<sup>-1</sup> for lactococci and lactobacilli. Cell dry weights of late exponential phase cultures expressed as cell dry mass were determined gravimetrically.

**Table 5.1.** Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Description <sup>a</sup>	Source and/or reference <sup>b</sup>
<b>Strains</b>		
<i>Lactobacillus sakei</i> Lb790	Host strain, meat isolate, non-bacteriocin producer	(Schillinger and Lücke, 1989)
<i>Lactobacillus plantarum</i> NC8	Host strain, silage isolate, plasmid free	(Aukrust and Blom, 1992)
<i>Lactobacillus casei</i> CECT475	Host strain, cheese isolate, also recorded as strain ATCC393	CECT
<i>Lactococcus lactis</i> MG1363	Source of SP <sub>usp45</sub> , plasmid-free and prophage-cured derivative of <i>L. lactis</i> NCDO 712	(Gasson, 1983)
<i>Enterococcus faecium</i> T136	Enterocin A and B producer, source of <i>entA</i> and <i>entiA</i> , control strain	DNBTA (Casaus et al., 1997)
<i>Enterococcus faecium</i> P13	Enterocin P producer, control strain MPA and ADT indicator	DNBTA (Cintas et al., 1997)
<b>Plasmids</b>		
pSIP409	Em <sup>r</sup> ; pSIP401 with 256 <sub>rep</sub> and P <sub>orfX</sub> :: <i>gusA</i>	(Sørvig et al, 2005)
pSIP411	Em <sup>r</sup> ; pSIP401 with SH71 <sub>rep</sub> and P <sub>orfX</sub> :: <i>gusA</i>	(Sørvig et al, 2005)
pMG36c	Cm <sup>r</sup> , pMG36e derivative	RUG-MG (Van de Guchte et al., 1989)
pSIP409UAI	Em <sup>r</sup> ; pSIP409 derivative encoding the PCR product UAI (SP <sub>usp45</sub> fused to mature <i>entA</i> and <i>entiA</i> genes)	This work
pSIP411UAI	Em <sup>r</sup> ; pSIP411 derivative encoding the PCR product UAI (SP <sub>usp45</sub> fused to mature <i>entA</i> and <i>entiA</i> genes)	This work
pMGUAI	Cm <sup>r</sup> , pMG36c derivative encoding the SP <sub>usp45</sub> fused to mature <i>entA</i> and <i>entiA</i> genes)	(Borrero et al., 2011b)

<sup>a</sup> ADT, agar well diffusion test; MPA, microtitre plate assay; Cm<sup>r</sup>, chloramphenicol resistance; Em<sup>r</sup>, erythromycin.

<sup>b</sup> ATCC, American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA); CECT, Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, Spain); DNBTA, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid (Madrid, Spain); NIZO, Department of Biophysical Chemistry, NIZO Food Research (Ede, The Netherlands); RUG-MG, Department of Molecular Genetics, University of Groningen (Haren, The Netherlands).

**5.2.2. Basic genetic techniques and enzymes.** Total genomic DNA *L. lactis* MG1363 and *E. faecium* T136 was isolated using the Wizard<sup>®</sup> DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). Plasmid DNA isolation was carried out using the QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), as suggested by the manufacturer, but cells were suspended with lysozyme (40 mg ml<sup>-1</sup>) and mutanolysin (500 U ml<sup>-1</sup>) and incubated at 37°C for 10 min before following the kit instructions. DNA restriction enzymes were supplied by New England Biolabs (Beverly, MA, USA). Ligations were performed with the T4 DNA ligase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). *E. coli* XL10 Gold competent cells were transformed as described by the supplier. Competent *L. lactis* MG363 and *Lactobacillus* spp. cells were electrotransformed with a Gene Pulser<sup>™</sup> and Pulse Controller apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), according to Holo and Nes (1989) and Aukrust and Blom (1992), respectively.

**5.2.3. PCR amplification and nucleotide sequencing.** Oligonucleotide primers were obtained from Sigma-Genosys Ltd. (Cambridge, UK). PCR-amplifications of inserts were performed as previously described (Borrero et al. 2011b). The PCR-generated fragments were purified by a NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany) for cloning and nucleotide sequencing. Nucleotide sequencing of purified PCR products was done using the ABI PRISM<sup>®</sup> BigDye<sup>™</sup> Terminator cycle sequence reaction kit and the automatic DNA sequencer ABI PRISM, model 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), at the Unidad de Genómica (Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain).

**5.2.4. Recombinant plasmids derived from pSIP409, pSIP411 and pMG36c.** The primers and inserts used for the construction of the recombinant plasmids derived from pSIP409 and pSIP411 are listed in **Table 5.2**. Plasmid derivatives were constructed as follows: the primer pair USPNC-F/JJ8-R was used for PCR-amplification from total genomic DNA of *L. lactis* MG1363 of a 124-pb *Nco*I fragment (UA) encoding the SP<sub>usp45</sub>, with a tail complementary to the N-terminal sequence of EntA. Primers JJ3-F/JJ5-R were used for PCR-amplification from total genomic DNA of *E. faecium* T136 of a 475-bp *Xho*I fragment (AI) containing mature *entA* and *entiA*. Mixtures of fragments UA and AI were used as templates to amplify the 567-bp *Nco*I/*Xho*I fragment UAI encoding mature *entA* and *entiA* fused to the SP<sub>usp45</sub>. Fragment UAI was digested with the corresponding restriction enzymes and inserted into either pSIP409 and pSIP411, digested with *Nco*I/*Xho*I. The ligation mixtures were used to transform *E. coli* XL10 Gold and *L. lactis* MG1363 competent cells, respectively, and the selected plasmid derivatives pSIP409UAI and pSIP411UAI were checked by bacteriogenicity tests, PCR and sequencing of the inserts. The construction of plasmid pMGUAI has been described previously (Borrero et al., 2011b). Plasmids pSIP409UAI, pSIP411UAI and pMGUAI were used to transform competent cells of *Lb. sakei* Lb790, *Lb. plantarum* NC8 and *Lb. casei* CECT475.

**5.2.5. Antimicrobial activity of the recombinant *Lactobacillus* spp. strains.** The antimicrobial activity of colonies from the recombinant *Lactobacillus* spp. strains was examined by the stab-on-agar test (SOAT), as previously described (Cintas et al. 1997).

When appropriate, cultures were induced with 50 ng ml<sup>-1</sup> of the SppIP (Eijsink et al., 1996) inducing peptide (Molecular Biology Unit, Newcastle University, UK) at an OD<sub>600</sub> of, approximately, 0.3 and the induced cultures were grown at 30 °C during 5 h. Cell-free culture supernatants were obtained by centrifugation of cultures at 12,000 x g at 4°C for 10 min, adjusted to pH 6.2 with 1 M NaOH, filtered through 0.2 µm pore-size filters (Whatman Int. Ltd., Maidstone, UK), and stored at -20°C until use. The antimicrobial activity of the supernatants was examined by a microtiter plate assay (MPA), as previously described (Borrero et al. 2011b), using *E. faecium* P13 as the indicator microorganism. With the MPA, growth inhibition of the sensitive culture was measured spectrophotometrically at 620 nm with a microtitre Labsystems iEMS plate reader (Labsystems, Helsinki, Finland). One bacteriocin unit (BU) was defined as the reciprocal of the highest dilution of the bacteriocin causing 50% growth inhibition (50% of the turbidity of the control culture without bacteriocin). The antimicrobial activity of the recombinant *Lactobacillus* spp. hosts was also tested against selected *Listeria* spp. obtained from the CECT (Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia, Spain), using the MPA.

**5.2.6. ELISA for detection and quantification of EntA.** Polyclonal antibodies with predetermined specificity for EntA and a non-competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay (NCI-ELISA) were used to detect and quantify the EntA in supernatants of the recombinant *Lactobacillus* spp. strains, essentially as described (Borrero et al, 2011b). Briefly, wells of flat-bottom polystyrene microtitre plates (Maxisorp, Nunc, Roskilde, Denmark) were coated overnight (4°C) with supernatants from *E. faecium* T136 or the recombinant strains. After addition of the anti-EntA specific antibodies and the goat anti-rabbit immunoglobulin G peroxidase conjugate (Cappel Laboratories, West Chester, PA, USA), bound peroxidase was determined with ABTS (2,2'-azino-bis[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid]) (Sigma) as the substrate by measuring the absorbance of the wells at 405 nm with a Labsystems iEMS reader (Labsystems) with a built-in software package for data analysis.

**5.2.7. Purification of EntA and mass spectrometry analyses.** EntA was purified from *Lb. sakei* Lb790 (pSIP411UAI) and *Lb. casei* CECT475 (pSIP411UAI), as previously described (Borrero et al. 2011b). Briefly, supernatants from early stationary phase 1-L cultures of the recombinant *Lactobacillus* spp. strains were precipitated with ammonium sulfate, desalted by gel filtration, and subjected to cation-exchange and hydrophobic-interaction chromatography, followed by reverse-phase chromatography in a fast-protein liquid chromatography system (RP-FPLC) (GE Healthcare, Barcelona, Spain). Purified fractions were subjected to matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry, as previously described (Borrero et al., 2011b).

**Table 5.2.** Primers and PCR products used in this study

Primer or PCR product	Nucleotide sequence (5'-3') or description	Amplification
Primers		
JJ3-F	ACCACTCATAGTGGAAAATATTATGG	AI
JJ5-R	GGCGGAGCTCTCCAGGCATTAAAATTGAGATTTATCTCCATAATC	AI, UA, UAI
USPNC-F	GAATTCTCACCATGGGAAAAAAAAAAGATTATCTCAGCTATTTTAATGTCTAC	UA, UAI
JJ8-R	CCATAATATTTTCCACTATGAGTGGTAGCGTAAACACCTGACAACGG	UA
PCR products		
AI	475-bp <i>Xho</i> I fragment containing the mature enterocin A ( <i>entA</i> ) and immunity ( <i>entiA</i> ) genes	
UA	124-pb <i>Nco</i> I fragment containing the <i>usp45</i> signal peptide (SP <sub><i>usp45</i></sub> ) and the beginning of mature <i>entA</i>	
UAI	567-bp <i>Nco</i> I/ <i>Xho</i> I fragment containing the SP <sub><i>usp45</i></sub> fused to mature <i>entA</i> and <i>entiA</i>	

## 5.3. RESULTS

**5.3.1. Heterologous production and functional expression of EntA by different *Lactobacillus* spp. strains.** Cloning of quimeras of the lactococcal SP<sub>usp45</sub> fused to mature *entA* (EntA) and *entiA* (EntI) (fragment UAI) into plasmids pSIP409, pSIP411 and pMG36c permitted obtention of the plasmid derived vectors pSIP409UAI, pSIP411UAI and pMGUAI, respectively. Transformation of *Lb. sakei* Lb790, *Lb. plantarum* NC8 and *Lb. casei* CECT475 with plasmids pSIP409UAI, pSIP411UAI and pMGUAI yielded recombinant *Lactobacillus* spp.-derived strains which were further checked by bacteriocinogenicity tests, PCR and sequencing of the inserts. Halos of inhibition of variable sizes were observed by all transformed *Lactobacillus* spp. (results not shown).

**Table 5.3.** Bacteriocin production and antimicrobial activity of supernatants from recombinant strains

Strain	Bacteriocin production (µg/mg cell dry weight) <sup>a</sup>	Antimicrobial activity (BU/mg cell dry weight) <sup>b</sup>	Specific antimicrobial activity (BU/µg EntA) <sup>c</sup>
<i>Lactobacillus sakei</i>			
Lb790	NP	NA	NE
Lb790 (pSIP409UAI)	1.3	324	249
Lb790 (pSIP411UAI)	5.2	1,578	303
Lb790 (pMGUAI)	0.7	48	68
<i>Lactobacillus plantarum</i>			
NC8	NP	NA	NE
NC8 (pSIP409UAI)	0.4	42	105
NC8 (pSIP411UAI)	0.4	36	90
NC8 (pMGUAI)	0.3	19	63
<i>Lactobacillus casei</i>			
CECT475	NP	102	NE
CECT475 (pSIP409UAI)	1.7	958	1,629
CECT475 (pSIP411UAI)	9.3	16,466	1,771
CECT475 (pMGUAI)	1.1	869	790
<i>Enterococcus faecium</i>			
T136 <sup>d</sup>	1.9	721	379

Most of the data are mean from two independent determinations in triplicate.

NP, no production, NA, no activity, NE, not evaluable.

<sup>a</sup> Production of EntA was calculated by using a NCI-ELISA with polyclonal antibodies specific for EntA.

<sup>b</sup> Antimicrobial activity was calculated against *E. faecium* P13 (EntA<sup>s</sup>). BU, bacteriocin units.

<sup>c</sup> Specific antimicrobial activity refers to the antimicrobial activity against *E. faecium* P13 divided by the EntA produced.

<sup>d</sup> Culture of *E. faecium* T136 used as control for production and antimicrobial activity of EntA.

The production and functional expression of the EntA in supernatants of the recombinant *Lactobacillus* spp. strains was further quantified using specific anti-EntA antibodies in a NCI-ELISA, and by a microtitre plate assay (MPA). None of the *Lactobacillus* spp. strains transformed with the empty vectors showed production of EntA (**Table 5.3.**). The production of EntA by *Lb. sakei* Lb790 (pSIP411UAI) and *Lb. casei* CECT475 (pSIP411UAI) was 2.7- and 4.9-fold higher, respectively, whereas production of EntA by *Lb. plantarum* NC8 (pSIP411UAI) was 4.7-times lower than production of EntA by *E. faecium* T136. The production of EntA by *Lb. sakei* Lb790, *Lb. plantarum* NC8 and *Lb. casei* CECT475 transformed with either pSIP409UAI or pMGUAI, was 1.1- to 6.3-times lower than production of EntA by *E. faecium* T136 (**Table 5.3.**).

When supernatants of the recombinant *Lb. sakei* Lb790, *Lb. plantarum* NC8 and *Lb. casei* CECT475 strains were evaluated for their antimicrobial activity against *E. faecium* P13 (EntA<sup>S</sup>), the antimicrobial activity (AA) of *Lb. sakei* Lb790 (pSIP411UAI) was 2.2-fold higher while its specific antimicrobial activity (SAA) was 1.2-times lower than the EntA produced by *E. faecium* T136 (**Table 5.3.**). *Lb. sakei* Lb790 (pSIP409UAI) showed 2.2-times lower AA and 1.5-times lower SAA and *Lb. sakei* Lb790 (pMGUAI) showed 15-times lower AA and 5.5-times lower SAA, when compared to the control EntA producer. All *Lb. plantarum* NC8 recombinants showed a 17.1- to 38-times lower AA and 3.6- to 6.0-times lower SAA, when compared to the control EntA producer. However, transformation of *Lb. casei* CECT475 with plasmids pSIP409UAI, pSIP411UAI and pMGUAI generated supernatants with 1.3-, 22.8- and 1.2-fold higher AAA and 4.3-, 4.7- and 2.1-fold higher SAA, respectively, than those from *E. faecium* T136 (**Table 5.3.**).

Furthermore, the evaluation of the antimicrobial activity of supernatants from the recombinant *Lb. sakei* Lb790, *Lb. plantarum* NC8 and *Lb. casei* CECT475 against five *Listeria* spp. and six *L. monocytogenes* strains, showed that supernatants from *Lb. sakei* Lb790 (pSIP411UAI) displayed 3.8-times lower to 2.7-fold higher AA whereas those from *Lb. sakei* Lb790 (pSIP409UAI) and *Lb. sakei* Lb790 (pMGUAI) showed 1.8- to 9.1-times lower and a 6.0- to 45-times lower AA, respectively, than those from *E. faecium* T136. Supernatants from all recombinant *Lb. plantarum* NC8 strains showed a 4.9- to 120-times much lower AA than the control EntA producer (**Table 5.4.**). However, despite the measurable and non-previously reported antimicrobial activity of *Lb. casei* CECT475, the supernatants from *Lb. casei* CECT475 (pSIP409UAI) showed 1.6- to 13.9-fold higher AA, those from *Lb. casei* CECT475 (pSIP411UAI) showed 15.7- to 59.2-fold higher AA and those from *Lb. casei* CECT475 (pMGUAI) showed 0.54- to 4.9-fold higher AA than those from *E. faecium* T136 (**Table 5.4.**).

**Table 5.4.** Antimicrobial activity of supernatants from recombinant *Lactobacillus* spp. strains against *Listeria* spp.<sup>a</sup>

Strain	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. grayii</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>					
	913	931	919	917	910	911	935	936	939	4031	4032
<i>Lactobacillus sakei</i>											
Lb790	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Lb790 (pSIP409UAI)	1,450	2,575	1,797	2,012	1,019	1,387	1,254	3,317	508	545	1,427
Lb790 (pSIP411UAI)	5,317	12,350	15,045	7,866	6,485	10,852	10,533	15,454	1,661	1,316	1,418
Lb790 (pMGUAI)	897	643	537	297	191	361	264	701	584	598	407
<i>Lactobacillus plantarum</i>											
NC8	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NC8 (pSIP409UAI)	641	551	255	360	140	288	250	623	451	853	224
NC8 (pSIP411UAI)	920	960	484	137	462	653	721	1,159	684	1,010	162
NC8 (pMGUAI)	890	692	713	112	121	501	595	843	525	765	85
<i>Lactobacillus casei</i>											
CECT475	965	920	103	793	201	243	307	524	506	356	890
CECT475 (pSIP409UAI)	44,433	37,711	21,713	21,916	24,091	36,639	42,977	57,145	48,839	59,408	18,740
CECT475 (pSIP411UAI)	185,567	202,356	179,199	211,214	182,181	255,191	180,191	250,101	206,942	293,825	157,331
CECT475 (pMGUAI)	34,804	12,417	5,619	7,320	2,656	4,630	15,315	14,350	17,310	20,983	7,379
<i>Enterococcus faecium</i>											
T136 <sup>b</sup>	9,668	4,599	5,555	13,419	4,582	4,165	3,876	5,663	3,495	4,996	5,096

Most of the data are mean from two independent determinations in triplicate.

NA, no activity

<sup>a</sup> Antimicrobial activity expressed in BU per milligrams cell dry weight.

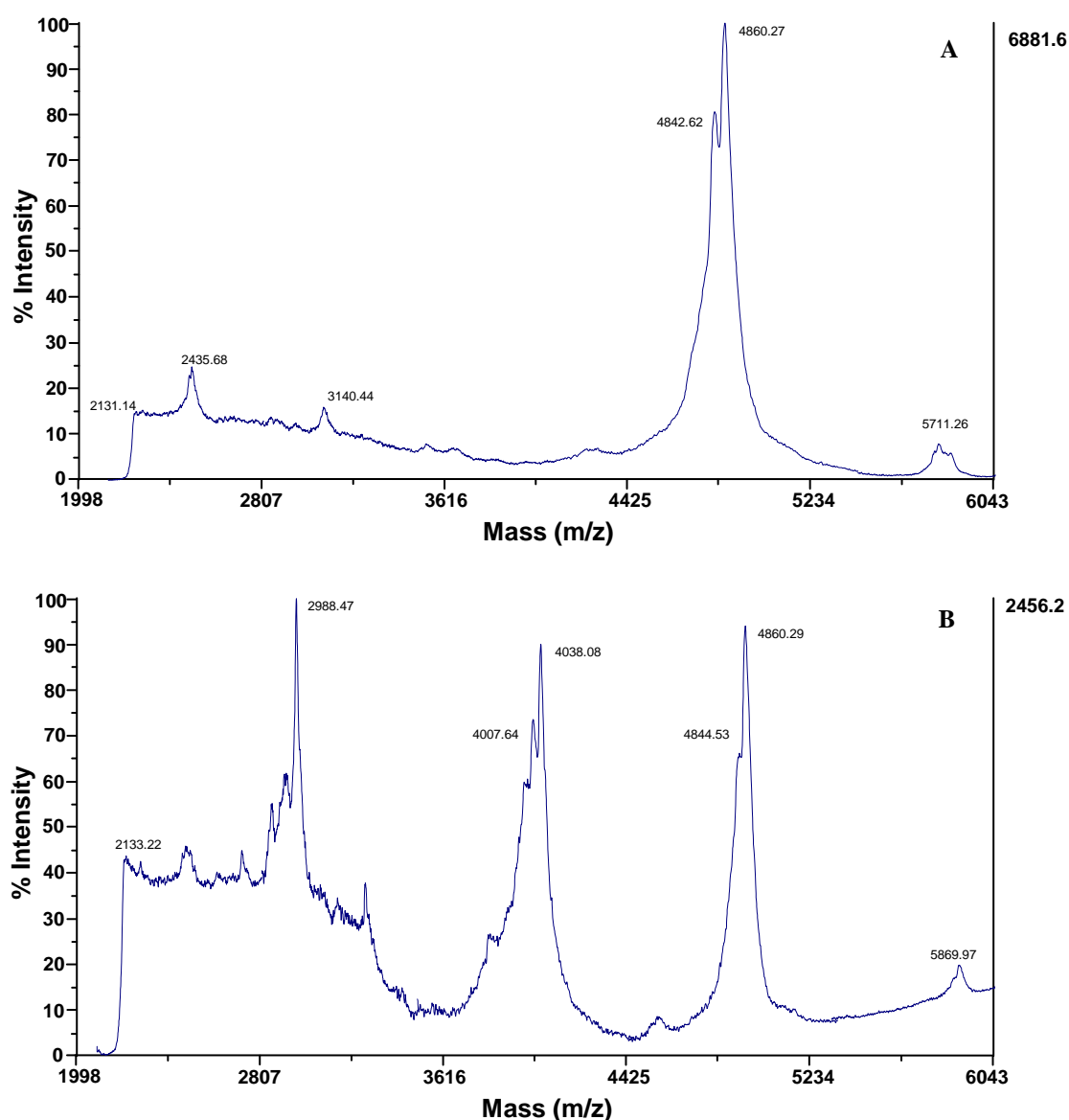
<sup>b</sup> Culture of *E. faecium* T136 used as control for antimicrobial activity of EntA



**5.3.2. Purification of EntA and mass spectrometry analysis.** The EntA produced by *Lb. sakei* Lb790 (pSIP411UAI) and *Lb. casei* CECT475 (pSIP409UAI) was purified to homogeneity following a previously described chromatographic procedure (results not shown). MALDI-TOF MS analysis of the purified EntA from *Lb. sakei* Lb790 (pSIP411UAI) showed a major peptide fragment of a molecular mass of 4,842.62 Da (**Fig 5.1.A**), nearly identical to the EntA produced by different recombinant yeasts (Borrero et al., 2012) while the purified EntA produced by *Lb. casei* CECT475 (pSIP411UAI) showed peptide fragments of different molecular mass among which a peptide fragment of 4,844.53 Da, nearly identical to the observed molecular mass (4,844.40 Da) of the EntA produced by *E. faecium* T136 (Borrero et al., 2011b), was also observed (**Fig 5.1.B**). In both purifications the peptide fragment of 4,860.2 Da may correspond to oxidation (+16 Da) of the methionine residue (Met<sup>33</sup>) of the EntA to methionine sulfoxide (MetSO) (**Fig 5.1.**). The visualization by MALDI-TOF MS of peptide fragments of different molecular mass (**Fig 5.1.B**) may suggest that the EntA produced by *Lb. casei* CECT475 (pSIP411UAI) has not been purified to homogeneity or that these peptides could be responsible of the low antimicrobial activity observed in supernatants of *Lb. casei* CECT475. However, treatment of crude supernatants of the control strain *Lb. casei* CECT474 with proteinase K (1 mg/ml) determined that the antimicrobial activity of the supernatants was not of proteinaceous nature (results not shown).

## 5.4. DISCUSSION

Lactobacilli are common colonisers of the human gastrointestinal and urogenital tracts, skin and the oral cavity and they merit recognition as starters in the production of fermented products, and as probiotics (Lebeer et al, 2008; Tsapieva et al., 2011). They are also being evaluated for production of functional foods enriched in bioactive peptides (Sah et al., 2014). Furthermore, production of bacteriocins by lactobacilli could find their use as natural antimicrobial peptides while bacteriocin-producing lactobacilli could be evaluated for their improved functionality as probiotics. Several gene expression systems have been developed for efficient overproduction of heterologous proteins in LAB (Mierau and Kleerebezem, 2005; Sørvig et al., 2005; Karlskås et al., 2014). Previous studies have also evaluated the production, secretion and functional expression of the EntA by different LAB, mostly of the genera *Lactococcus*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* (Martínez et al., 2000; Martín et al., 2007; Borrero et al., 2011b) and yeasts (Borrero et al., 2012; Jiménez et al., 2014). However, of great biotechnological interest would be the construction of recombinant *Lactobacillus* spp. for production of bacteriocins with known and potent antimicrobial activity against *Listeria* spp.



**Figure 5.1.** Mass spectrometry analysis of purified enterocin A from *Lb. sakei* Lb790 (pSIP411UAI) (A), and from *Lb. casei* CECT475 (pSIP411UAI) (B).

For protein expression by *Lb. sakei* and *Lb. plantarum* but also for other *Lactobacillus* spp., the so-called pSIP expression vectors permits expression of the gene of interest under control of an inducible promoter by an externally added peptide pheromone (Sørvig et al., 2005; Karlskås et al., 2014). The pSIP system has been successfully applied for intracellular expression, secretion and surface anchoring of a variety of proteins in *Lb. plantarum* and *Lb. sakei* (Karlskås et al., 2014). However, although these pSIP vectors have been evaluated for expression of different reporter proteins, they have not been yet fully evaluated for secretion and functional expression of bacteriocins. In these vectors the expression of genes of interest is driven by strong, regulated promoters derived from the bacteriocin sakacin P structural gene ( $P_{sppA}$ ) or the sakacin Q structural gene ( $P_{sppQ}$  also recorded as  $P_{orfX}$ ) with an engineered *NcoI* site for translational fusion cloning, as well as for components of the cognate two-

component signal transduction system (SppK and SppR) which responds to an externally added peptide pheromone (SppIP). These vectors also carries a multicloning site (MCS) and the replicon derived from the narrow-host-range *Lactobacillus* replicon from plasmid p256 (pSIP409) or the broad-host-range, high-copy-number replicon from plasmid pSH71(pSIP411) (Sørvig et al., 2005). The expression vector pMG36c contains the low copy replication origin of plasmid pWV01 and the strong P<sub>32</sub> promoter to drive the constitutive transcription of inserted genes into the multicloning site (MCS) of pUC18 (van de Guchte et al., 1989). Different homologous and heterologous signal peptides (SPs) have been also evaluated for secretion of heterologous proteins and bacteriocins by LAB, although expression yield and secretion efficiency are not only steered by the SP but also the host producer (Borrero et al., 2001b; Jiménez et al., 2013; Karlskås et al., 2014).

In this work, *Lb. sakei* Lb790, *Lb. plantarum* NC8 and *Lb. casei* CECT475 were transformed with plasmids pSIP409UAI, pSIP411UAI and pMGUAI encoding the SP<sub>usp45</sub>-mature *entA* + *entiA* for heterologous production of EntA and evaluation of its functional expression against *Listeria* spp. The results obtained suggest that production, secretion and antimicrobial activity of the EntA produced depend on the expression vector and the host strain (**Table 5.3.**). EntA producers are protected from the antagonistic effect of this bacteriocin by the concomitant expression of a cognate immunity protein (EntiA) and bacteriocins of the class IIa, such as the EntA use components of the mannose phosphotransferase system (Man-PTS) of the susceptible cells as the target/receptor. The immunity proteins form a strong complex with the receptor proteins, thereby preventing cells from being killed (Diep et al., 2007; Kjos et al., 2011). Of interest is the 2.7- and 4.9-fold enhanced production of EntA by *Lb. sakei* Lb790 (pSIP411UAI) and *Lb. casei* CECT475 (pSIP411UAI), respectively, as compared to the rest of recombinant *Lactobacillus* spp. and *E. faecium* T136 (**Table 5.3.**). The production of EntA would depend, among other factors, on plasmid stability and copy number differences between pSIP409, pSIP411 and pMG36c but, more likely, might be caused by promoters used to drive gene expression. For optimization of protein production inducible systems are often considered superior to constitutive systems since the short induction time for bacteriocin production from the pSIP-inducible vectors most probably prevents EntA from attaching to cell walls, forming aggregates, and/or undergoing protease degradation (Gutiérrez et al., 2006). The high-copy number replicon of pSIP411 may be also a contributing factor to the higher production of EntA by *Lactobacillus* spp. recombinants transformed with pSIP411UAI instead of pSIP409UAI.

Protein secretion is a preferred means of protein expression in the development of LAB as cell factories for production of biologically active compounds (Mathiesen et al., 2008). However, it may happen that SP<sub>usp45</sub> could modulate differently the secretion of EntA by the recombinant *Lb. sakei* Lb790, *Lb. plantarum* NC8 and *Lb. casei* CECT47 hosts, as it appeared with secretion of EntA and other bacteriocins by different LAB (Borrero et al., 2011b; Jiménez et al., 2013). It may also happen that mature EntA remain N-terminally associated to the cell membrane of the producer cells via a Sec-type signal peptide that is not cleaved off during secretion (Bøhle et al., 2011). The different molecular folding of EntA

inside the less EntA-producing recombinant *Lb. plantarum* hosts may also maintain the prepeptide in an secretion-incompetent conformation (Mathiesen et al., 2009). It is known that *Lb. plantarum* NC8 encodes three two-peptide plantaricins of narrow inhibitory spectra, regulated by a quorum sensing based network, but unable to produce bacteriocins as pure cultures in liquid media (Maldonado-Barragán et al., 2009). Thus, variations in bacteriocin secretion capacities may be also governed by autoinducer peptide production and recognition and post-transcriptional factors such as codon usage, mRNA stability and translational efficiency that may steer EntA production from the recombinant *Lb. sakei* Lb790 and *Lb. plantarum* NC8 (Diep et al., 2009b). New variants of the modular pSIP-vectors, encoding different SPs, have been tested for inducible gene expression and reporter protein secretion in *Lactobacillus* spp. All recombinant strains secreted the target protein nuclease A (NucA), albeit with different production levels (Karlskås et al., 2014).

In this work, polyclonal antibodies of predetermined specificity for EntA and an NCI-ELISA have permitted evaluation of the specific antimicrobial activity (SAA) of the produced EntA against *E. faecium* P13 (EntA<sup>S</sup>). From the *Lb. sakei* Lb790-derived recombinants, only *Lb. sakei* Lb790 (pSIP411UAI) showed a 2.2-fold higher antimicrobial activity (AA) but a 1.2-times lower SAA than the EntA produced by *E. faecium* T136 (**Table 5.3.**). All *Lb. plantarum* NC8 recombinants showed a much lower AA and SAA when compared to the control EntA producer. However, all *Lb. casei* CECT475-derived recombinants generated supernatants with higher AA and SAA than those from *E. faecium* T136. Of interest is the 22.8-fold higher AA and the 4.7-fold higher SAA of supernatants of *Lb. casei* CECT475 (pSIP411UAI) (**Table 5.3.**). According to these results, is important to consider that not always a higher bacteriocin production by recombinant LAB may report a higher AA and SAA (Borrero et al., 2011a; Jiménez et al., 2013). The low AA and SAA of the EntA produced by the *Lb. sakei* Lb790- and *Lb. plantarum* NC8-hosts may depend on many factors which are difficult to determine. It is possible that: (i) regulatory responses to secretion stress activate quality control networks of the producer cells involving folding factors and housekeeping proteases (Darmon et al., 2002), (ii) differences in the Sec-dependent translocation and Sec-machinery, differences in protein folding, and conformational modifications of bacteriocins to a less extracellular active form may also decrease the antagonistic activity of the secreted EntA (Sarvas et al., 2004), (iii) secretion of truncated bacteriocins may also lower the antimicrobial activity of the producer cells (Jiménez et al., 2013), (iv) the formation of disulfide bonds (DSB) from the four cysteine residues in EntA may also play a role in the folding, structural integrity, and antimicrobial activity of the produced bacteriocin (Freitas et al., 2005), and (v) the EntA contains a methionine residue that may change to an apparently less active form due to its oxidation to methionine sulfoxide (Johnsen et al., 2000). The lower AA and SAA of the produced EntA may be also adscribed to differences in protein folding efficiency and bacteriocin self-aggregation (Borrero et al., 2011b). Although *Lb. sakei* and *Lb. plantarum* have been considered appropriate hosts for the recombinant production of a number of reporter proteins and enzymes (Halbmayer et al., 2008; Bömer et al., 2012; Morais et al., 2013; Karlskås et al., 2014), the results of this work resolve *Lb. casei* CECT475 as the preferred host for heterologous production and functional expression of the bacteriocin EntA.

Supernatants from all recombinant *Lb. casei* CECT475 hosts, producers of EntA, showed up to a 59.2-fold higher AA against *Listeria* spp. than any other *Lb. sakei* Lb790- or *Lb. plantarum* NC8-recombinant producer of EntA (**Table 5.4.**). Furthermore, *Lb. casei* CECT (pSIP411UAI) an inducible overproducer of EntA with higher AA and SAA in its supernatants than those from *E. faecium* T136, could be considered as a cellular factory and an alternative to *E. faecium* T136 for production and recovery of the highly active antilisterial bacteriocin EntA. The controlled production of EntA by *Lb. casei* CECT475 (pSIP411UAI) and the constitutive production of this bacteriocin by *Lb. casei* CECT475 (pMGUAI) could be also evaluated as a contributing antilisterial effect of *Lb. casei* CECT475, also cited as *Lb. casei* ATCC393, during further evaluation of the potential of the *Lb. casei* CECT475-derived recombinant strains during production of dry-fermented sausages (Sayas-Barbera et al., 2012; Sidira et al., 2014), production of antithrombotic and angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides (ACEIP) from bovine casein (Rojas-Ronquillo et al., 2012) or during production of antioxidant and antimutagenic peptides from yogurt (Sah et al., 2014).

The use as bacteriocin producers of recombinant *Lb. casei* CECT475-derived strains, generally recognized as safe (GRAS) and with a qualified presumption of safety (QPS), may also provide means by which the potential benefits of antimicrobial compounds can be exploited in the food industry, human and veterinary applications, and in the animal production field. The combined use of the inducible protein expression vector pSIP411 and *Lb. casei* CECT475 as the producer host, would also merit recognition as a novel gene expression system for the efficient overproduction and functional expression of EntA by *Lb. casei*.

## 5.5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express their gratitude to Prof L. Axelsson (NOFIMA, The Norwegian Institute of Food, Fisheries and Aquaculture Research) and Prof. J. Kok (Department of Genetics, University of Groningen, The Netherlands), for supplying plasmids pSIP409 and pSIP411, and pMG36c, respectively. This work was partially supported by grants AGL2012-34829 from the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) and AGL2009-08348 from the Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN), by grant GR35-10A from the BSCH-UCM, and by grant S2013/ABI-2747 from the Comunidad de Madrid (CAM). J.J. Jiménez is recipient of a fellowship (FPI) from the Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN), J. Borrero held a research contract from the CAM, and L. Gútiez held a fellowship (FPU) from the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC), Spain.

## 5.6. REFERENCES

- Aukrust, T. and Blom, H. (1992). Transformation of *Lactobacillus* strains used in meat and vegetable fermentations. *Food Res. Int.* 25:253-261.
- Bøhle, L.A., Riaz, T., Egge-Jacobsen, W., Skaugen, M., Busk, Ø.L., Eijssink, V.G.H. and Mathiesen, G. (2011). Identification of surface proteins in *Enterococcus faecalis* V583. *BMC Genomics.* 12:135.

- Böhmer, N., Lutz-Whal, S. and Fisher, L. (2012). Recombinant production of hyperthermostable CelB from *Pyrococcus furiosus* in *Lactobacillus* spp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96:903-912.
- Borrero, J., Jiménez, J.J., Gútiez, L., Herranz, C., Cintas, L.M. and Hernández, P.E. (2011a). Use of the *usp45* lactococcal secretion sequence signal sequence to drive the secretion and functional expression of enterococcal bacteriocins in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89:131-143.
- Borrero, J., Jiménez, J.J., Gútiez, L., Herranz, C., Cintas, L.M. and Hernández, P.E. (2011b). Protein expression vector and secretion signal peptide optimization to drive the production, secretion, and functional expression of the bacteriocin enterocin A in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* 156:76-86.
- Borrero, J., Kunze, G., Jiménez, J.J., Böer, E., Gútiez, L., Herranz, C., Cintas, L.M. and Hernández, P.E. (2012). Cloning, production and functional expression of the bacteriocin enterocin A, produced by *Enterococcus faecium* T136, by the yeasts *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha* and *Arxula adeninivorans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:5956-5961.
- Casaus, P., Nilsen, T., Cintas, L.M., Nes, I.F., Hernández, P.E. and Holo, H. (1997). Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* 143:2287-2294.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Håvarstein, L.S., Hernández, P.E. and Nes, I.F. (1997). Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4321-4330.
- Corr, S.D., Li, Y., Riedel, C.U., O'Toole, P.W., Hill, C. and Gahan, G.G.M. (2007). Bacteriocin production as a mechanism for the anti-infective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:7617-7621.
- Corr, S.C., Hill, C. and Gahan, C.G.M. (2009). Understanding the mechanisms by which probiotics inhibit gastrointestinal pathogens. *Adv. Food Nutr. Res.* 56:1-15.
- Cotter, P.D., Ross, R.P. and Hill, C. (2013). Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nature. Microbiol. Rev.* 11:95-105.
- Darmon, E., Noone, D., Masson, A., Bron, S., Kuipers, O.P., Devine, K.M. and van Dijk, J.M. (2002). A novel class of heat and secretion stress-responsive genes is controlled by the autoregulated CsrRS two-component system of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 184, 5661-5671.
- Diep, D.B., Skaugen, M., Salehian, Z., Holo, H. and Nes, I.F. (2007). Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:2384-2389.
- Diep, D.B., Straume, D., Kjos, M., Torres, C. and Nes, I.F. (2009a). An overview of the mosaic bacteriocin pln loci from *Lactobacillus plantarum*. *Peptides* 30:1562-1574.
- Diep, D.B., Mathiesen, G., Eijsink, V.G.H. and Nes, I.F. (2009b). Use of lactobacilli and their pheromone-based regulatory mechanism in gene expression and drug delivery. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 10:62-73.
- Dobson, A., Cotter, P.D., Ross, R.P. and Hill, C. (2012). Bacteriocin production: a probiotic trait? *Appl. Environ. Microbiol.* 78:1-6.

- Eijsink, V.G.H., Brurberg, M., Hans Middelhoven, P. and Nes, I.F. (1996). Induction of bacteriocin production in *Lactobacillus sake* by a secreted peptide. *J. Bacteriol.* 178:2232-223.
- Freitas, D.A., Leclerc, S., Miyoshi, A., Oliveira, S.C., Sommer, P.S.M., Rodrigues, L., Correa, A., Gautier, M., Langella, P., Azevedo, V.A. and Le Loir, Y. (2005). Secretion of *Streptomyces tendae* antifungal protein 1 by *Lactococcus lactis*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38:1585-1592.
- Gasson, M.J. (1983). Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J. Bacteriol.* 154:1-9.
- Gutiérrez, J., Larsen, R., Cintas, L.M., Kok, J. and Hernández, P.E. (2006). High-level heterologous production and functional expression of the sec-dependent enterocin P from *Enterococcus faecium* P13 in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72:41-51.
- Halbmayer, E., Mathisien, G., Nguyen, T-H., Maischberger, T., Peterbauer, C.K., Eijsink, C.G.H. and Haltrich, D. (2008). High-level expression of recombinant  $\beta$ -galactosidases in *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus sakei* using a sakacin P-based expression system. *J. Agric. Food. Chem.* 56:4710-4719.
- Håvarstein, L.S., Diep, D.B. and Nes, I.F. (1995). A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitantly with export. *Mol. Microbiol.* 16:229-240.
- Hazerbrouck, S., Oozeer, R., Adel-Patient, K., Langella, P., Rabot, S., Wal, J.M. and Corthier, G. (2006). Constitutive delivery of bovine  $\beta$ -lactoglobulin to the digestive tracts of gnotobiotic mice by engineered *Lactobacillus casei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:7460-7467.
- Holo, H. and Nes, I.F. (1989). High-frequency transformation by electroporation of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:3119-3123.
- Jiménez, J.J., Borrero, J., Diep, D.B., Gútiérrez, L., Nes, I.F., Herranz, C., Cintas, L.M. and Hernández, P.E. (2013). Cloning, production and functional expression of the bacteriocin sakacin A (SakA) and two SakA-derived chimeras in lactic acid bacteria (LAB) and the yeasts *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40:977-993.
- Jiménez, J.J., Borrero, J., Gútiérrez, L., Arbulu, S., Herranz, C., Cintas, L.M. and Hernández, P.E. (2014). Use of synthetic genes for cloning, production and functional expression of the bacteriocins enterocin A and bacteriocin E 50-52 by *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Biotechnol.* (in press)
- Johnsen, L., Fimland, G., Eijsink, V. and Nissen-Meyer, J. (2000). Engineering increased stability in the antimicrobial peptide pediocin PA-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4798-4802.
- Kahn, H., Flint, S. and Yu, P.L. (2010). Enterocins in food preservation. *Int. J. Food. Microbiol.* 141:1-10.
- Karlskås, I.L., Maudal, K., Axelsson, L., Rud, I., Eijsink, V.G.H. and Mathiesen, G. (2014). Heterologous protein secretion in lactobacilli with modified pSIP vectors. *PLoS ONE* 9(3): e91125. doi:10.1371/journal.pone.0091125.

- Kjos, M., Borrero, J., Opsata, M., Birri, D.J., Holo, H., Cintas, L.M., Snipen, L., Hernández, P.E., Nes, I.F. and Diep, D.B. (2011). Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Microbiology* 157:3256-3267.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J. and De Keersmacker, S.C.J. (2008). Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72:728-764.
- Maldonado-Barragán, A., Ruíz-Barba, J.L. and Jiménez-Díaz, R. (2009). Knockout of three component regulatory systems reveal that the apparently constitutive plantaricin-production phenotype shown by *Lactobacillus plantarum* on solid medium is regulated via quorum sensing. *Int. J. Food Microbiol.* 130:35-42.
- Martín, M., Gutiérrez, J., Criado, R., Herranz, C., Cintas, L.M. and Hernández, P.E. (2007). Cloning, production and expression of the bacteriocin enterocin A produced by *Enterococcus faecium* PLBC21 in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76:667-675.
- Martínez, J.M., Kok, J., Sanders, J.W. and Hernández, P.E. (2000). Heterologous co-production of enterocin A and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*: detection by specific peptide-directed antibodies. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3543-3549.
- Mathiesen, G., Sveen, A., Brurberg, M.B., Fedriksen, L., Axelsson, L. and Eijsink, V.G.H. (2009). Genome-wide analysis of signal peptide functionality in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *BMC Genomics* 10:425.
- Mathiesen, G., Sveen, A., Piard, J.C., Axelsson, L. and Eijsink, V.G.H. (2008). Heterologous protein secretion by *Lactobacillus plantarum* using homologous signal peptides. *J. Appl. Microbiol.* 105:215-226.
- Mierau, I. and Kleerebezem, M. (2005). 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68:705-717.
- Moraïs, S., Shterzer, N., Grinberg, I.R., Mathiesen, G., Eijsink, V.G.H., Axelsson, L., Lamed, R., Bayer, E.A. and Mizrahi, I. (2013). Establishment of a *Lactobacillus plantarum* cell consortium for cellulase-xylanase synergistic interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:5242-5249.
- Natale, P., Brügger, T. and Driessen, A.J.M. (2008). Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane: distinct translocases and mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1778:1735-1756.
- Nes, I.F., Yoon, S.S. and Diep, D.B. (2007). Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: A review. *Food Sci. Biotechnol.* 16:675-690.
- Nilsen, T., Nes, I.F. and Holo, H. (2007). An exporter inducer regulates bacteriocin production in *Enterococcus faecium* CTC492. *J. Bacteriol.* 180:1848-1854.
- O'Keefe, T., Hill, C. and Ross, R.P. (1999). Characterization and heterologous expression of the genes encoding enterocin A production, immunity and regulation in *Enterococcus faecium* DPC1146. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1506-1515.
- Riboulet-Bisson, E., Sturme, M.H.J., Jeffery, I.B., O'Donnell, M.M., Neville, B.A., Forde, B.M., Claesson, M.J., Harris, H., Gardiner, G.E., Casey, P.G., Lawlor, P.G., O'Toole, P.W. and Ross, R.P. (2012). Effect of *Lactobacillus salivarius* bacteriocin Abp118 on the mouse and pig intestinal microbiota. *PLoS ONE* 7(2): e31113.



- Rojas-Ronquillo, R., Cruz-Guerrero, A., Flores-Nájera, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruíz, L., Reyes-Grajeda, J.P., Jiménez-Guzmán, J. and García-Garibay, M. (2012). Antithrombotic and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties of peptides released from bovine casein by *Lactobacillus casei* Shirota. *Int. Dairy J* 26:147-14.
- Sah, B.N.P., Vasiljevic, T., McKechnie, S. and Donkor, O.N. (2014). Effect of probiotics on antioxidant and antimutagenic activities of crude peptide extract from yoghurt. *Food Chem.* 156:264-270.
- Sarvas, M., Harwood, C.R., Bron, S. and van Dijl, J.M. (2004). Post-translocational folding of secretory proteins in Gram-positive bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1694, 311-327.
- Sayas-Barberá, E., Viuda-Martos, M., Fernández-López, F., Pérez-Alvarez, J.A. and Sendra, E. (2012). Combined use of a probiotic culture and citrus fiber in a traditional sausage "Longaniza de Pascua". *Food Cont.* 27:343-350.
- Schillinger, U. and Lücke, F.K. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1901-1906.
- Sidira, M., Galanis, A., Nikolau, A. and Kanellaki, M. (2014). Evaluation of *Lactobacillus casei* ATCC 393 protective effect against spoilage of probiotic dry-fermented sausages. *Food Cont.* 42:315-330.
- Sørvig, E., Mathiesen, G., Naterstad, K., Eijsink, V.G.H. and Axelsson, L. (2005) High-level, inducible gene expression in *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus plantarum* using versatile expression vectors. *Microbiol.* 151:2439-2449.
- Tsapieva, A., Duplik, and Suvorov, A. (2011). Structure of plantaricin locus of *Lactobacillus plantarum* 8P-A3. *Benef. Microb.* 2:255-261.
- van de Guchte, M., van der Vossen, J.M.B.M., Kok, J. and Vemena, G. (1989). Construction of a lactococcal expression vector: expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:224-228.
- van Hemert, S., Meijerink, M., Molenaar, D., Bron, P.A., de Vos, P., Kleerebezem, M., Wells, J.M. and Marco, M.L. (2010). Identification of *Lactobacillus plantarum* genes modulating the cytokine response of human peripheral blood mononuclear cells. *BMC Microbiol.* 10:293.

# CAPÍTULO / CHAPTER 6

***Enterococcus faecalis* DBH18, un enterococo con potenciales aplicaciones biotecnológicas codifica los genes productores de bacteriocinas *ef1097* y *entL50A-entL50B* y genes similares a la *entL50A-entL50B* denominados *entJSA* y *entJSB***

---

***Enterococcus faecalis* DBH18, an enterococcal strain with potential biotechnological applications encodes the bacteriocin-producing genes *ef1097* and *entL50A-entL50B*, and the *entL50A-entL50B*-like genes termed *entJSA* and *entJSB***



## ABSTRACT

Purified genomic DNA from *Enterococcus faecalis* DBH18 was PCR-amplified with primers derived from *ef1097*, encoding the enterococcin V583 (EntV583) from *E. faecalis* V583, and with primers derived from *entL50A-entL50B* encoding the enterocin L50 (EntL50A and EntL50B) from *E. faecium* L50. Nucleotide sequencing of the resulting fragments initially suggested that *E. faecalis* DBH18 encodes *ef1097*, *entL50A-entL50B*, and an *entL50B*-like gene termed *entJSB*. The *entL50A-entL50B* sequence was identical in *E. faecalis* DBH18 and *E. faecium* L50, whereas nested-PCR results suggest that these genes may be located in a different genetic locus in both enterococcal strains. Nucleotide sequencing, by inverse genetics, of genes adjacent to *entJSB* in *E. faecalis* DBH18 revealed twelve putative open reading frames (ORFs), including *entJSA-entJSB*. The evaluation of the antimicrobial activity of the *entL50A*, *entL50B*, *entJSA* and *entJSB* gene products, obtained by an *in vitro* combined transcription/translation assay, unequivocally supports that *entJSA* and *entJSB* are required for production and biological expression of the enterocin JS (EntJSA and EntJSB), that EntL50A and EntL50 display a higher antimicrobial activity than EntJSA and EntJSB, and that the antagonistic activity of the *in vitro* produced EntL50A, EntL50B, EntJSA and EntJSB depends on the activity and synergism of their individual components. MALDI-TOF MS analysis of purified bacteriocins from supernatants of *E. faecalis* DBH18, suggest the presence of N-terminal formylated methionine in the primary amino acid sequences of EntL50 and EntJS.

**Keywords:** *Enterococcus faecalis*; enterocins; enterocin L50 (EntL50A and EntL50B); enterocin JS (EntJSA and EntJSB); Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*)



## 6.1. INTRODUCTION

The enterococci are lactic acid bacteria (LAB) that play a beneficial role in fermented foods, being employed as starters in the food industry and as probiotics for humans and animals (Franz et al., 2011). They compete with other bacteria due to the production of ribosomally synthesized peptides with antimicrobial activity, generally referred to as enterocins (Nes et al., 2014), and considerable research interest has focused on bacteriocins produced by enterococci due to their potential use as natural and nontoxic food preservatives and for pharmaceutical, nutraceutical, veterinary, and medical applications (Gálvez et al., 2007; Khan et al., 2010; Borrero et al., 2011a; Jiménez et al., 2013). Furthermore, bacteriocin production may be also considered a probiotic trait associated with strain dominance, infection control and host cell signalling (Dobson et al., 2012). However, the enterococci are gastro-intestinal tract (GI) colonizers with lifestyles ranging from intestinal symbionts to multidrug-resistant pathogens responsible for nosocomial and, to a lesser extent, community-acquired infections (Willems et al., 2011).

Bacteriocin biosynthesis is carried out by several biosynthetic proteins that are encoded near the bacteriocin structural gene and which are usually recognized in an operon (Nes et al., 1996). Most bacteriocins from LAB are synthesized as biologically inactive precursors or prepeptides containing an N-terminal extension. The mature peptides are generally classified into the lanthionine-containing lantibiotics (class I) and the non-lanthionine-containing bacteriocins (class II) (Cotter et al., 2005). A new classification scheme has grouped the enterococcal bacteriocins in class I (lantibiotic), class II (nonlantibiotic), class III (cyclic), and class IV (large proteins) (Franz et al., 2007). Additional subgroups have been also suggested for leaderless bacteriocins, circular bacteriocins, linear peptides derived from large proteins and the glycosylated bacteriocins (Kjos et al., 2011). The class II bacteriocins are also recorded as class IIa, comprising the pediocin-like bacteriocins, and class IIb comprising the two-peptide bacteriocins, circular bacteriocins, leaderless bacteriocins and other small heat-stable bacteriocins (Nes et al., 2014).

The N-terminal extensions of most lantibiotics and class II bacteriocins are of the so-called double-glycine type (leader sequence) and are cleaved off concomitantly with export across the cytoplasmatic membrane by dedicated adenosine triphosphate-binding cassette transporters (ABC-transporters) and their accessory proteins (Håvarstein et al., 1995). However, some class II bacteriocins contain N-terminal extensions of the so-called Sec type (signal peptide), which functions as a targeting and recognition signal and which is proteolytically cleaved concomitantly with bacteriocin externalization by the general secretory pathway (GSP) or Sec-dependent pathway (Driessen and Nouwen, 2007; Natale et al., 2008). There are, however, some class II bacteriocins such as enterocin L50 (EntL50A and EntL50B) (Cintas et al., 1998), enterocin Q (Cintas et al., 2000), aureocin A70 (Netz et al., 2001), aureocin A53 (Netz et al., 2002), enterocin EJ97 (Sánchez-Hidalgo et al., 2003), bacteriocin LsbB (Gajic et al., 2003), bacteriocin BHT-B (Hyink et al., 2005), lacticin Q (Fujita et al., 2007), lacticin Z (Iwatani et al., 2007), weissellicin Y and weissellicin M (Masuda et al., 2012), and epidermicin NI01 (Sandiford and Upton, 2012) termed leaderless

bacteriocins, that are not synthesized with a N-terminal extension and that all contain methionine as the N-terminal residue. Furthermore, their secretion seems to be performed by dedicated transport systems involving ABC-transporters, which, in some cases, could also contribute to bacteriocin immunity (Gajic et al., 2003; Criado et al., 2006a, Iwatani et al., 2013).

The enterococci are being actively evaluated not only for their antimicrobial, hygienic and safety aspects associated to their presence in different substrates and ecological niches but also for their potential biotechnological applications. The existence in foods of *E. faecalis* strains with potent antimicrobial activity and multiple virulence factors raises concerns regarding their potential pathogenicity to consumers (Martín et al., 2006; Sánchez et al., 2007). However, their most active enterocins, used as cell-free preparations or heterologously produced by safer microbial hosts, may be attractive as natural antimicrobial agents in food, pharmaceutical, veterinary, and medical applications (Borrero et al., 2012; Jiménez et al., 2014). We report in this study that *E. faecalis* DBH18, isolated from Mallard ducks (*A. platyrhynchos*) (Sánchez et al., 2007), and an active producer, during its growth in bovine skim milk (BSM), of BSM-derived bioactive peptides with human and health connotations and potential biotechnological applications (Gútiérrez et al., 2013; Gutiérrez et al., 2014), encodes the bacteriocin-producing genes *ef1097* and *entL50A-entL50B* as well as the *entL50A-entL50B*-like genes termed *entJSA* and *entJSB*, the latter in a gene cluster of twelve putative open reading frames (ORFs) including *entJSA-entJSB*.

## 6.2. MATERIALS AND METHODS

**6.2.1. Bacterial strains, media, and growth conditions.** *E. faecalis* DBH18 (Sánchez et al., 2007) and *E. faecium* L50 (Cintas et al., 1998), were propagated in MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) at 32°C. Other LAB, food-spoilage, and food-borne pathogenic bacteria were used as indicators of the antimicrobial activity of *E. faecalis* DBH18 (**Table 6.5**). LAB strains were grown in MRS medium (Oxoid) at 32°C. *Listeria* spp. and *Staphylococcus* spp. were propagated in Brain Heart Infusion (BHI) medium (Oxoid) at 32°C. *Propionobacterium* spp. and *Clostridium* spp. were propagated in BHI medium (Oxoid) at 32°C and 37°C, respectively, in anaerobic jars. *Brocothrix thermosphacta* and *Pseudomonas fluorescens* were grown in TSB (Tryptone Soya Broth) medium (Oxoid), at 32°C. *E. coli* JM109 (Promega, Madison, WI, USA) was grown in Luria-Bertani (LB) broth (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) at 37°C. *E. coli* NovaBlue Singles<sup>TM</sup> Competent Cells (Merck, Darmstadt, Germany) were grown on LB plates with carbenicillin (50 µg/ml) (Merck), tetracycline (15 µg/ml) (Sigma-Aldrich), X-Gal (70 µg/ml) (Sigma-Aldrich) and IPTG (80 µM) (Sigma) at 37°C. Agar plates were made by the addition of 1.5% (w/v) agar (Oxoid) to the broth media. Cell dry weights of late exponential phase cultures expressed as cell dry mass were determined gravimetrically.

**6.2.2. Bacteriocinogenic activity assays.** Cell-free culture supernatants of *E. faecalis* DBH18 and *E. faecium* L50 were obtained by centrifugation at 12,000 g at 4 °C for 10 min, adjusted to pH 6.2 with 1 M NaOH, filtered through 0.25 µm pore-size sterile syringe filters

(Whatman Int. Ltd., Maidstone, UK), and stored at -20°C. The antagonistic activity of supernatants was evaluated by the agar diffusion test (ADT) and, when stated, by a microtiter plate assay (MPA), performed as previously described (Cintas et al., 2000). With the MPA, growth inhibition of the sensitive microorganism was measured spectrophotometrically at 620 nm with a microtiter Labsystems iEMS plate reader (Labsystems, Helsinki, Finland). One bacteriocin unit (BU) was defined as the reciprocal of the highest dilution of the bacteriocin causing 50% growth inhibition (50% of the turbidity of the control culture without bacteriocin). The antimicrobial activity and the synergistic effect of the *in vitro* synthesized peptides EntL50A, EntL50B, EntJSA and EntJSB, was tested individually and combined in a 1:1 ratio against different indicator microorganisms by the use of an spot-on-agar test (Cintas et al., 1998), and the MPA.

**6.2.3. Basic genetic techniques.** Purified genomic DNA was obtained using the Wizard® DNA Purification Kit (Promega) or Advamax beads (Advanced Genetic Technologies Corp., Gaithersburg, MD, USA). PCR-amplifications were performed in 50 µl reaction mixtures with 1-3 µl of purified DNA, 70 pmol of each primer and 1 U of Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen S.A., Barcelona, Spain). Samples were subjected to an initial cycle of denaturation (97°C for 2 min), followed by 35 cycles of denaturation (94°C for 45 sec), annealing (50 to 62 °C for 30 sec) and elongation (72 °C for 15 sec to 3 min), ending with a final extension step at 72°C for 7 min in a gradient thermal cycler Techne TC-512 (Techne, Cambridge, UK). The oligonucleotide primers used in this work (Sigma) are shown in **Table 6.1**. The PCR generated fragments were analyzed by electrophoresis in 2% agarose (Pronadisa, Madrid, Spain) gels with the Gel Doc 1000 documentation system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). When required, the PCR-generated fragments were purified with the QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) or by agarose gel electrophoresis, followed by extraction with a QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). Nucleotide sequencing of purified PCR products was performed with the ABI PRISM® BigDye™ Terminator cycle sequencing kit and the automatic DNA sequencer ABI PRISM, model 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). For isolation and purification of resident plasmids, the cultures were processed with the QIAGEN Plasmid Mini and Midi Kits (QIAGEN) as described by the manufacturer, with addition of lysozyme (40 mg/ml) and mutanolysin (500 U/ml).

**6.2.4. PCR-amplification of genomic DNA of *E. faecalis* DBH18 and *E. faecium* L50.** Purified genomic DNA of *E. faecalis* DBH18 and *E. faecium* L50 was used as template for amplification with primers EF1097-F3 and EF1097-R3 (**Table 6.1**), deduced from the *ef1097* gene of *E. faecalis* V583 (Swe et al., 2007). Similarly, primers shown in **Table 6.1** were used to amplify fragments containing the enterocin L50 (EntL50A and EntL50B) structural genes (*orfA* and *orfB*) and the adjacent genes (*orfC*, *orfD*, *orfE*, *orfF*, and *orfG*), as described in *E. faecium* L50 (Cintas et al., 1998).



**Table 6.1.** Oligonucleotides used in PCR-amplification reactions and DNA sequencing

Oligonucleotide	Nucleotide sequence (5' → 3')	Comments
EF1097-F3	GGCGATGGCATTACTAATGACATTAGG	Amplification of <i>ef1097</i>
EF1097-R3	CTTAGCCCACATTGAACTGCCCATAAAGC	Amplification of <i>ef1097</i>
EntL50-R1	ATGGGAGTAATCGCAAATTAGTAGC	Amplification of <i>entL50AB</i>
EntL50-R2	TTAATGTCTTTTAGCCATTTTCAATTGATC	Amplification of <i>entL50AB</i>
L50J40-F	AAAAATGATTGGAGGAGTTATATTATG	Nested PCR experiences
L50J40-R	CGAATGTTTACACAACAAAAAAC	Nested PCR experiences
GL50B-F	AAAACATATAGTCAGTCTCAATCACTG	Nested PCR experiences
EL50B-F	ATAACGCCCCCTTATGCTTT	Nested PCR experiences
L50J45-F	TTTGCAACAATACATCTTCTATG	Nested PCR experiences
L50J45-R	GGATATCCTTATAACTTTATAGTCTTTTTTC	Nested PCR experiences
L50AD-R	GAAAGGCCTACGGCTCAAG	Nested PCR experiences
L50AC-R	CTAACGGCTTCAGCATTTGA	Nested PCR experiences
JoC1F	GCAAAGTTTGGATGGCCATTTATT	Sequencing of <i>entJSB</i> containing fragments
JoC2F	ATGGGAGCAATCGCAAATTAGTA	Sequencing of <i>entJSB</i> containing fragments
JoC3R	CATAATTTGTTTGTAGAATTTTTTAATAAA	Sequencing of <i>entJSB</i> containing fragments
JoC4R	TTAATGTCTTTTAGCCATTTTCAAT	Sequencing of <i>entJSB</i> containing fragments
JoC5F	TACTATGAAATAATAAGTATATCCTTG	Sequencing of <i>entJSB</i> containing fragments
JoC6R	TTAACATAAGATAATTTAAAACATTTC	Sequencing of <i>entJSB</i> containing fragments
JoC6BR	GTAGAAAAAACTTGTTATTAACATAAG	Sequencing of <i>entJSB</i> containing fragments
JoC6CR	AAATACTATGAAATAACAAGGATATAC	Sequencing of <i>entJSB</i> containing fragments
EJS1-F	AACGATTAATACTCTTCCGGCAGGG	Sequencing of <i>entJSB</i> containing fragments
EJS2-F	GTGGATATTCCATTGATTACATTCCC	Sequencing of <i>entJSB</i> containing fragments
JJ6-R	CCGAGTCGCCCTGCCGGAAG	Sequencing of <i>entJSB</i> containing fragments
JJ12-R	CGGTCCCATAGCCCCAGG	Sequencing of <i>entJSB</i> containing fragments
JJ15-R	CCTGTATTTGTTGGAGAACTCG	Sequencing of <i>entJSB</i> containing fragments
JJ21-F	GGCTGGATTACCTCAGTGGG	Sequencing of <i>entJSB</i> containing fragments
JJ23-F	CTTAGTTACTTGAATATTCCCG	Sequencing of <i>entJSB</i> containing fragments
JJ29-R	CTGTTACTGTGGGCAATAAC	Sequencing of <i>entJSB</i> containing fragments
JJ30-F	CAGACGATTCTTCGACTAAG	Sequencing of <i>entJSB</i> containing fragments
JJ32-F	GGAGTTAAACCCGATAAGG	Sequencing of <i>entJSB</i> containing fragments
JJ33-R	GCTGAAAATAGGTACAGACAC	Sequencing of <i>entJSB</i> containing fragments
JJ34-F	CGGCGAATGTTGATTTATCC	Sequencing of <i>entJSB</i> containing fragments
JJ35-F	GAGTATGAAGGAGGTTACAAG	Sequencing of <i>entJSB</i> containing fragments

---

JJ36-R	GCATACACCGAACTACCAG	Sequencing of <i>entJSB</i> containing fragments
JJ37-R	GCTTGTAGTGGATTACAGC	Sequencing of <i>entJSB</i> containing fragments
JJ38-F	GTCCAAATCAGTGTTCCAATG	Sequencing of <i>entJSB</i> containing fragments
JJ39-F	CTGGCATTAGGGAACAGTTTG	Sequencing of <i>entJSB</i> containing fragments
JJ40-R	GCTGCCACTTATTGGTC	Sequencing of <i>entJSB</i> containing fragments
JJ41-F	GTTTGATTGAGAGTAACACAG	Sequencing of <i>entJSB</i> containing fragments
JJ42-F	GAGTATCCTAAGGTGAATGTG	Sequencing of <i>entJSB</i> containing fragments
JJ43-R	CTGGCATTAGGGAACAGTTTG	Sequencing of <i>entJSB</i> containing fragments
JJ44-R	GTGTTGAACGATTCCAATTCC	Sequencing of <i>entJSB</i> containing fragments
JJ1B-R	CTGTAGATAAGTCTACATCTTG	Sequencing of <i>entJSB</i> containing fragments
JJ2B-F	GTCATAGAACATTTCGCAATTC	Sequencing of <i>entJSB</i> containing fragments
JSA-F	ATGGGAGCAATTGCAAAATTAGTAGCAAAG	<i>In vitro</i> transcription/translation assay
JSA-R	TTAAATATGTTTTTTGATCCAATCAATAATTTT	<i>In vitro</i> transcription/translation assay
EntC-F	ATGGGAGCAATCGCAAAATTAGTAGC	<i>In vitro</i> transcription/translation assay
EntC-J	CAACCTATACCATTAAAGTCAAACGATATCAG	<i>In vitro</i> transcription/translation assay
EntC-R	TCAATGTCTTTTAAACCATTTTCAATTTGATC	<i>In vitro</i> transcription/translation assay

---

**6.2.5. Sequencing of *entJSA-entJSB* and adjacent genes.** Purified genomic DNA from *E. faecalis* DBH18 was digested with the blunt-end restriction enzymes *HincII*, *BsaI*, *EcoRV*, *PvuII*, and *DraI* (New England BioLabs, Beverly, MA, USA), and ligated to the *EcoRV*-digested pCR-Blunt II-TOPO sequencing vector (Invitrogen). These ligation mixtures were used as templates in PCRs, which were carried out with combinations of specific primers deduced from the nucleotide sequence of the 132-bp fragment obtained from *E. faecalis* DBH18, and the vector-derived primers. The PCR-generated fragments were analyzed by agarose gel electrophoresis, purified and sequenced, and new specific primers were deduced from sequencing of the resulting PCR products. Homology searches of the DNA sequences were performed with the BLAST algorithm (Altschul et al., 1997), available at the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

**6.2.6. Cloning of *entJSA* and *entJSB* in *Escherichia coli* and *in vitro* transcription/translation assay.** Purified genomic DNA from *E. faecalis* DBH18 was used as target DNA for PCR amplification of a 1,212-bp fragment (fragment A), with primers EJS2-F and JoC3-R and a 292-bp fragment (fragment B), with primers EntC-F and EntC-J, deduced from the nucleotide sequence of *entJSA-entJSB*. Fragment A was further used as DNA template for amplification of *entJSA* with primers JSA-F and JSA-R (fragment JSA, 135-bp), while fragment B was also used as DNA template for amplification of *entJSB* with primers EntC-F and EntC-R (fragment JSB, 132-bp). Fragments JSA and JSB were then cloned using the Perfectly Blunt™ Cloning Kit (Merck) in the blunt vector pETBlue™-1, according to the procedure recommended by the manufacturer. The resulting plasmids pETBlueJSA and pETBlueJSB were further transformed in *E. coli* NovaBlue Singles™ Competent Cells. Further identification and selection of colonies containing plasmids pETBlueJSA and pETBlueJSB, with fragments JSA and JSB inserted in the correct orientation, were performed by PCR amplification of DNA from single *E. coli* colonies with the primer pairs EJS2-F/pETBlue1-Down and pETBlue1-Up/EJS2-R for plasmid pETBlueJSA, EntCF/pETBlue1-Down and pETBlue1-Up/EntC-R for plasmid pETBlueJSB, and pETBlue1-Up/pETBlue1-Down for both plasmids. Confirmation of the correct nucleotide sequence of fragments JSA and JSB was performed by nucleotide sequencing of the purified PCR-amplified fragments. The purified plasmids pETBlueJSA and pETBlueJSB were used as templates for the *in vitro* synthesis of the putative peptide products EntJSA and EntJSB using the *E. coli* T7 S30 Extract System for Circular DNA (Promega). EntL50A and EntL50B were also produced *in vitro* using the previously constructed plasmids pRSETB-*entL50A* and pRSETB-*entL50B* as templates (Cintas et al., 1998). The combined *in vitro* transcription/translation reactions were carried out at 37°C for 2 h, according to the procedure recommended by the manufacturer. Plasmid pETBlue-1 was used as control. The antimicrobial activity of the reaction products was determined by the spot-on-agar test and the MPA.

**6.2.7. ELISA assays.** Polyclonal antibodies with predetermined specificity for EntL50A and EntL50B and a noncompetitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay (NCI-ELISA), were used as previously described (Criado et al., 2006b).

**6.2.8. Purification of the bacteriocins produced by *E. faecalis* DBH18, mass spectrometry (MS) analysis, and *de novo* MS-MS peptide mapping.** The bacteriocins in the supernatants of *E. faecalis* DBH18 were purified to homogeneity as previously described (Borrero et al., 2011b; Jiménez et al., 2013). Briefly, supernatants from early stationary phase 1-L cultures of *E. faecalis* DBH18 were precipitated with ammonium sulfate, desalted by gel filtration, and subjected to cation-exchange and hydrophobic-interaction chromatography, followed by reverse-phase chromatography in a fast-protein liquid chromatography system (RP-FPLC) (GE Healthcare, Barcelona, Spain). The molecular mass of the bacteriocins was determined by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) as described previously (Borrero et al., 2011c). The purified bacteriocins were also digested by trypsin, either by a standard overnight protocol or in a micropipette tip and to facilitate their *de novo* tandem mass spectrometry (MS-MS) peptide mapping, the peptides were derivatized with a Lys tag and/or 4-sulfophenyl isothiocyanate (SPITC; Sigma), as previously described (Borrero et al., 2011c).

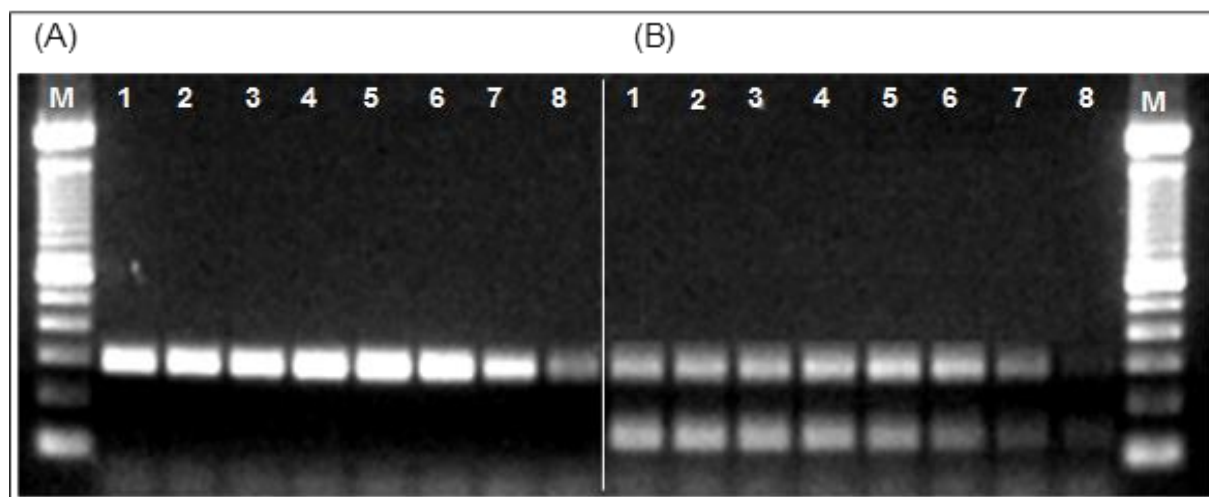
**6.2.9. Nucleotide sequence accession number.** The nucleotide sequence of *entJSA-entJSB* and their adjacent genes (11,456 base pairs), has been deposited in the GenBank database under accession number EF502034.

## 6.3. RESULTS

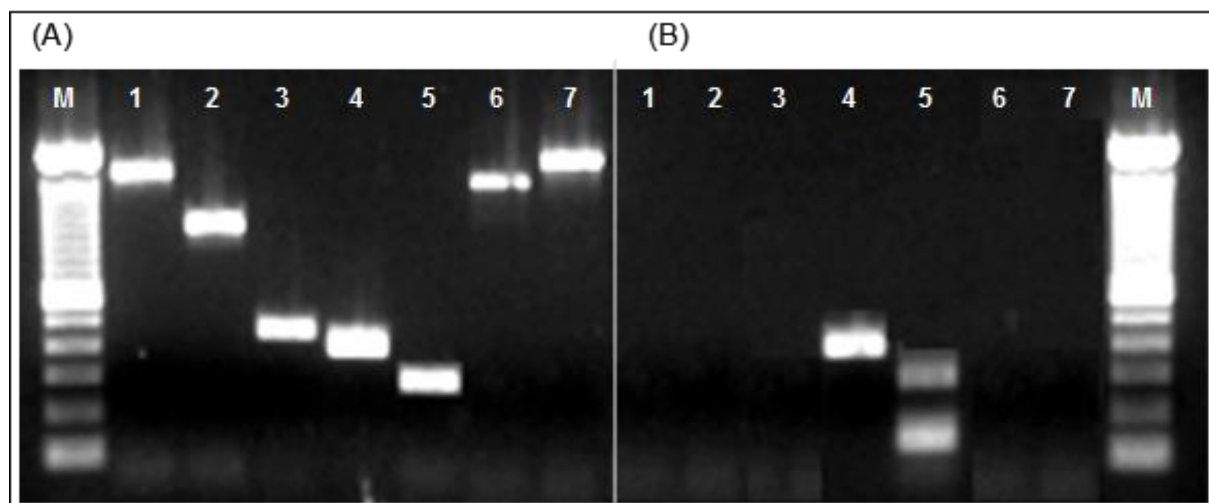
**6.3.1. PCR-amplification and nucleotide sequencing of bacteriocin-encoding genes of *E. faecalis* DBH18.** PCR-amplification of purified genomic DNA from *E. faecium* L50 and *E. faecalis* DBH18 showed that only purified genomic DNA from *E. faecalis* DBH18 permitted the amplification of a deduced 468-bp fragment (results not shown). This fragment was identical to *ef1097* of *E. faecalis* V583 encoding the hypothetical protein EF1097, renamed as enterococcin V583 (EntV583) (Swe et al., 2007), except for four minor nucleotide replacements with no effect on amino acid translation but, with a G to A replacement from tryptophan (TGG) to a translation termination codon (TGA). This nucleotide replacement was not present in the *ef1097* sequence from other *E. faecalis* isolates such as strains JH2-2, DBH9 and DCH9 (results not shown).

Similarly, PCR-amplification of purified genomic DNA from *E. faecium* L50 permitted amplification of a unique fragment of a predicted 286-bp length, whereas that of *E. faecalis* DBH18 permitted amplification of a fragment of a predicted 286-bp and a shorter fragment of around 130-bp length (**Fig. 6.1.**). The sequencing of the predicted 268-bp fragment from *E. faecium* L50 and *E. faecalis* DBH18 permitted identification of identical *entL50A-entL50B* sequences in both isolates. However, sequencing of the shorter (around 130-bp) fragment amplified from *E. faecalis* DBH18 yielded a nucleotide sequence of 132-bp, similar (termed *entJSB*) but not identical, to *entL50B* from *E. faecium* L50. The *entJSB* showed a nucleotide sequence similar to *entL50B* except for four minor nucleotide substitutions, leading to replacement of amino acids 9 and 15 of mature EntJSB from alanine (GCA) to threonine (ACA) and from phenylalanine (TTT) to leucine (CTA), respectively. Furthermore, determination of the nucleotide sequence of a predicted 400-bp fragment from genomic DNA

of *E. faecium* L50, confirmed the existence of an identical *entL50A-entL50B* sequence in both *E. faecium* L50 and *E. faecalis* DBH18 (results not shown). Nested PCR-amplification of purified genomic DNA from *E. faecalis* DBH18 and *E. faecium* L50 with primer pairs, deduced from *entL50A-entL50B* and adjacent genes from *E. faecium* L50, suggested that genes adjacent to *entL50A-entL50B* are not identical or are located in different loci in both *E. faecium* L50 and *E. faecalis* DBH18 (**Fig. 6.2.**).



**Figure 6.1.** PCR-amplification fragments of purified genomic DNA from *E. faecium* L50 (A) and *E. faecalis* DBH18 (B), using primers EntL50-R1 and EntL50-R2 and an annealing temperature gradient of 50.8° C (lane 1), 52.5° C (lane 2), 55.2° C (lane 3), 57.1° C (lane 4), 59.0° C (lane 5), 61.0° C (lane 6), 63.5° C (lane 7), and 64.9° C (lane 8). M, nucleic acid molecular size marker 100 bp DNA ladder.



**Figure 6.2.** Nested PCR-amplification of purified genomic DNA from *E. faecium* L50 and *E. faecalis* DBH18 for amplification of *entL50A* and *entL50B* and adjacent genes deduced from *E. faecium* L50. Results for *E. faecium* L50 (A). Lane 1, GL50B-F/EntL50-R2 (1,680-bp); lane 2, EL50B-F/EntL50-R2 (1,053-bp); lane 3, L50J45-F/L50J45-R (450-bp); lane 4, L50J40-F/L50J40-R (400-bp); lane 5, EntL50-R1/EntL50-R2 (286-bp and 132-bp); lane 6, EntL50-R1/L50AD-R (1,502-bp), and lane 7 EntL50-R1/L50AC-R (1,832-bp). Results for *E. faecalis* DBH18 (B). Lanes 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7, as cited above. M, nucleic acid molecular size marker 100-bp DNA ladder.

**6.3.2. Sequencing of the *entL50A-entL50B*-like genes and their adjacent genes in *E. faecalis* DBH18.** The sequencing by inverse genetics of purified genomic DNA from *E. faecalis* DBH18 permitted the determination of a DNA sequence of 11,456-bp including the

*entL50A-entL50B*-like genes termed *entJSA-entJSB* (GenBank, accession number EF502034). The assembled 11,456-bp contig revealed the presence of twelve putative open reading frames (ORFs) in the same frame and with the same transcription orientation that *entJSB* (Table 6.2.). It was also determined that 20-bp upstream of *entJSB* a sequence similar (termed *entJSA*) but not identical to that of *entL50A* from *E. faecium* L50 (Cintas et al., 1998), was found. The *entJSA* encodes a predicted 44-amino-acid peptide with a nucleotide sequence similar to *entL50A*, except for 7 minor nucleotide replacements with no effect on amino acid translation and a nucleotide T to G substitution that leads to a replacement in amino acid 38 of mature EntJSA, from aspartic acid (GAT) to glutamic acid (GAG). Ten more putative ORFs, designated *orf1* and *orf4* to *orf12*, were located adjacent to *entJSA-entJSB* (*orf2* and *orf3*, respectively) (Table 6.2.). The *orf1*, encodes a predicted 610-amino-acid protein with the stop codon 540-pb upstream the start codon of *entJSA*. The hypothetical protein encoded by *orf1* showed a 99% amino acid identity with the protein staphopain C47 (GenBank EFU12852) from *E. faecalis* TX1341, isolated from the human gastrointestinal (GI) tract. The *orf4*, *orf5* and *orf6* are located 221-, 491- and 764-bp downstream of the stop codon of *entJSB* and encode a hypothetical 89-, 88- and 139-amino-acid protein, respectively. The *orf7* is located 1,180-bp downstream of the stop codon of *entJSB* and encodes a 458-amino-acid hypothetical protein. The *orf8*, *orf9*, *orf10* and *orf11* are located 2,566-, 3,050-, 4,267-, and 4,947-bp, downstream of the stop codon of *entJSB* encoding a 163-, 406-, 227-, and 301-amino-acid hypothetical protein, respectively. The *orf12*, located 7,102-bp downstream of the stop codon of *entJSB*, encodes a 541-amino-acid hypothetical protein.

**6.3.3. In vitro transcription/translation of the *entJSA-entJSB* genes of *E. faecalis* DBH18.** Plasmid pETBlueJSA and pETBlueJSB encoding *entJSA* and *entJSB*, respectively, and plasmids pRSETB-*entL50A* and pRSETB-*entL50B* encoding *entL50A* and *entL50B* (Cintas et al., 1998), respectively, were used as templates for the *in vitro* synthesis of EntJSA, EntJSB, EntL50A and EntL50B. The antimicrobial activity of the synthesized peptides was tested individually and in a combined 1:1 ratio (v/v) against different indicator bacteria. The antimicrobial activity of EntL50A and EntL50B was greater in *P. damnosus* CECT4797 and *Lb. buchneri* CECT4032 than in *P. acidilactici* 347, and larger than that of EntJSA or EntJSB against the same indicator bacteria (Fig. 6.3.). However, whereas the antagonistic activity of EntA was usually higher than that of EntB, the antimicrobial activity of EntJSB was always higher than that of EntJSA. The combined use of *entL50A* and *entL50B* showed a synergistic antagonistic activity against all tested indicator bacteria, whereas the combined use of EntJSA and EntJSB showed only a synergistic effect against *P. damnosus* CECT4797 (Table 6.3.). The combined use of EntL50A with either EntL50B or EntJSB originated a larger synergistic antimicrobial effect against *P. acidilactici* 347 than the observed with EntJSA. The combined use of EntL50A, EntL50B, EntJSA and EntJSB also originated a larger synergistic effect against *P. acidilactici* 347 but not a clear synergistic activity against *P. damnosus* CECT4797 and *Lb. buchneri* CECT4032 (Table 6.3.).

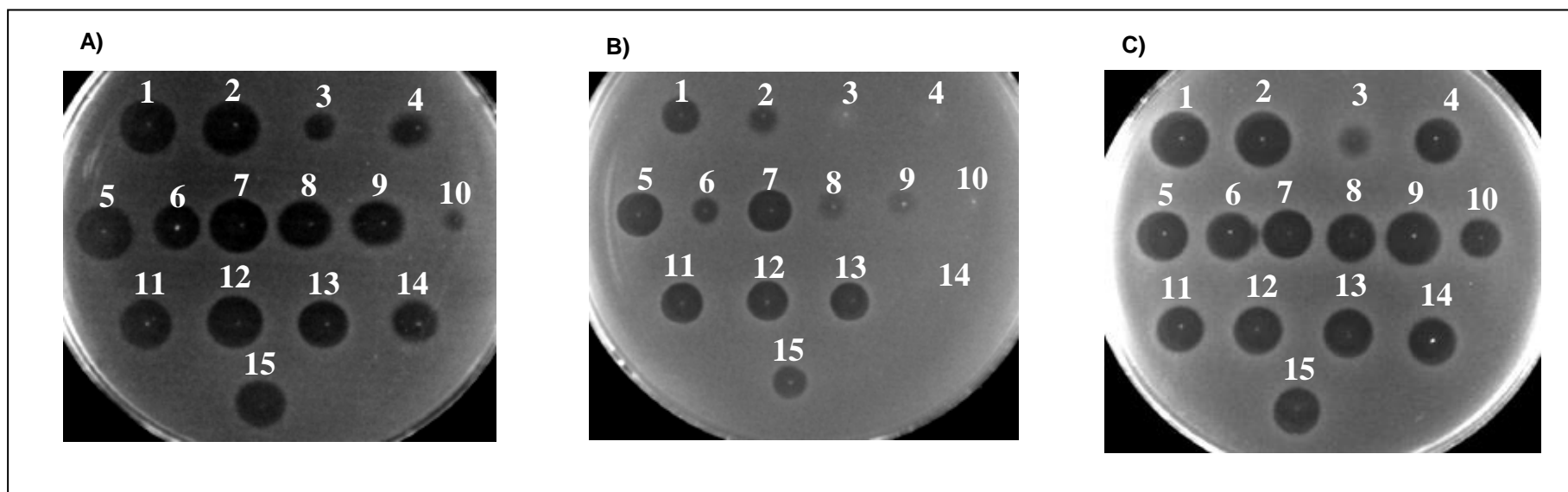
**Table 6.2.** Deduced ORFs in the 11,456-bp *entJSA-entJSB* containing fragment from *E. faecalis*DBH18 and closest relatives of the deduced proteins

ORF	Position in nucleotide sequence		Gene		Length (amino acids)	Molecular Mass (kDa)	pI	Protein Closest relative (length; e value; level of amino acid identity/level of amino acid similarity; microorganism)
	5'	3'	Designation	G+C content (%)				
ORF1	1	1,830	<i>orf1</i>	33.6	609	69.25	6.1	Hypothetical protein WUG_03214 and WOC_02852 (609 amino acids; 0.0; 99%/99%; <i>E. faecalis</i> EnGen0332 and <i>E. faecalis</i> EnGen0357, respectively); Staphopain peptidase C47 ( <i>E. faecalis</i> TX1341); Hypothetical protein WME_00497 (609 amino acids; 0.0; 98%/98%; <i>E. faecalis</i> EnGen0362)
ORF2	2,370	2,504	<i>entJSA</i>	28.2	44	5.18	10.0	Enterocin MR10A and enterocin NA (44 amino acids; 3e-21; 100%/100%; <i>E. faecalis</i> MRR 10-3 and <i>E. faecalis</i> N1-33, respectively); Enterocin 7A (44 amino acids; 1e-20; 100%/100%; <i>E. faecalis</i> 710C); Enterocin I, enterocin 62-6A, enterocin L50-A, hypothetical protein OK9_05741, and hypothetical protein OKQ_05404 (44 amino acids; 2e-20; 98%/100%; <i>E. faecium</i> 6T1a, <i>E. faecium</i> 62-6, <i>E. faecium</i> L50, <i>E. faecium</i> E980, <i>E. faecium</i> EnGen0033, and <i>E. faecium</i> EnGen0052, respectively)
ORF3	2,525	2,656	<i>entJSB</i>	31.1	43	5.18	10.2	Enterocin MR10B and enterocin NB (43 amino acids; 2e-21; 100% 100%; <i>E. faecalis</i> MRR 10-3 and <i>E. faecalis</i> N1-33, respectively); Enterocin 7B (43 amino acids; 1e-20; 100%/100%; <i>E. faecalis</i> 710C); Enterocin J, enterocin 62-6B, enterocin L50-B, hypothetical protein OK9_05740 and hypothetical protein OKQ_05403 (44 amino acids; 2e-20; 95%/95%; <i>E. faecium</i> 6T1a, <i>E. faecium</i> 62-6, <i>E. faecium</i> L50, <i>E. faecium</i> E980, <i>E. faecium</i> EnGen0033 and <i>E. faecium</i> EnGen0052, respectively)

ORF4	2,877	3,146	<i>orf4</i>	22.6	89	10.64	7.8	Hypothetical protein OGO_02476, hypothetical protein OK9_05742 and hypothetical protein OKQ_05390 (89 amino acids; 3e-48, 89%/94%; <i>E. faecium</i> EnGen0015, <i>E. faecium</i> EnGen0033 and <i>E. faecium</i> EnGen0052, respectively); Conserved hypothetical protein (89 amino acids; 2e-47; 88%94%; <i>E. faecium</i> E980); L50E and OrfE (89 amino acids; 3e-47; 88%/93%; <i>E. faecium</i> 6T1a and <i>E. faecium</i> L50, respectively)
ORF5	3,147	3,416	<i>orf5</i>	27.4	89	10.55	10.6	L50F and OrfF (90 amino acids; 9e-37; 73%/86%; <i>E. faecium</i> 6T1a and <i>E. faecium</i> L50, respectively); Conserved hypothetical protein, hypothetical protein OGO_02477, hypothetical protein OK9_05743 and hypothetical protein OKQ_05389 (90 amino acids; 5e-36; 72%/85%; <i>E. faecium</i> E98, <i>E. faecium</i> EnGen0015, <i>E. faecium</i> EnGen0033 and <i>E. faecium</i> EnGen0052)
ORF6	3,420	3,839	<i>orf6</i>	22.9	139	16.46	9.5	L50G, hypothetical protein OGO_02478, hypothetical protein OK9_05744, hypothetical protein OKQ_05388 (143 amino acids; 1e-66; 80%/92%; <i>E. faecium</i> E980, <i>E. faecium</i> EnGen0015, <i>E. faecium</i> EnGen0033 and <i>E. faecium</i> EnGen0052); L50G (143 amino acids; 1e-65; 80%/91%; <i>E. faecium</i> 6T1a); orfG (108 amino acids; 2e-43; 79%/90%; <i>E. faecium</i> L50)
ORF7	3,836	5,212	<i>orf7</i>	22.8	458	54.95	9.4	Hypothetical protein OK9_05745 (461 amino acids; 0.0; 74%/86%, <i>E. faecium</i> EnGen0033); Conserved hypothetical protein, hypothetical protein OGO_02479 and hypothetical protein OKQ_05387 (461 amino acids; 0.0, 74%/86%; <i>E. faecium</i> E980, EnGen0052, EnGen0052); Hypotetical protein pEF1_p10 (304 amino acids; 3e-149; 74%/86%; <i>E. faecium</i> 6T1a)
ORF8	5,222	5,713	<i>orf8</i>	24.8	163	18.58	8.9	AS-48E and hypothetical protein OKQ_05386 (165 amino acids; 2e-67; 73%/86%; <i>E. faecium</i> 6T1a and <i>E. faecium</i> EnGen0052, respectively); AS-48E, hypothetical protein OGO_02480 and hypothetical protein OK9_05746 (165 amino acids; 6e-66; 73%/85%; <i>E. faecium</i> E980, <i>E. faecium</i> EnGen0015 and <i>E. faecium</i> EnGen0033, respectively)



ORF9	5,706	6,926	<i>orf9</i>	31.9	406	45.17	5.7	Hypothetical protein (407 amino acids; 0.0; 96%/98%; <i>E. faecalis</i> S-48); Hypothetical protein Q9E_00799, hypothetical protein WOK_01939 and hypothetical protein Q9C_01818 (405 amino acids; 0.0; 96%/98%; <i>E. faecalis</i> EnGen0059, <i>E. faecalis</i> EnGen0359 and <i>E. faecalis</i> EnGen0063); AS-48F (407 amino acids; 0.0; 96%/98%; <i>E. faecalis</i> S-48); Hypothetical protein UK1_01735 (405 amino acids; 0.0, 96%/98%; <i>E. faecalis</i> EnGen0301)
ORF10	6,923	7,606	<i>orf10</i>	36.2	227	25.72	5.8	ABC transporter, ATP-binding protein (227 amino acids; 1e-62, 99%/99%; <i>E. faecalis</i> MTUP9, <i>E. faecalis</i> AZ19, <i>E. faecalis</i> EnGen0059, <i>E. faecalis</i> EnGen0301, <i>E. faecalis</i> EnGen0359 and <i>E. faecalis</i> EnGen0063, respectively); AS-48G, ABC transporter-ATP binding protein (227 amino acids; 8e-159, 97%/98%; <i>E. faecalis</i> Merz96)
ORF11	7,603	8,802	<i>orf11</i>	31.1	399	44.04	9.1	ABC transporter-ATP binding permease protein (399 amino acids; 0.0; 99%/99%; <i>E. faecalis</i> MTUP9); ABC transporter-permease protein, membrane subunit, efflux ABC transporter-permease protein (399 amino acids; 0.0; 98%/99%; <i>E. faecalis</i> AZ19); AS-48H, efflux ABC transporter-permease protein (399 amino acids; 0.0, 94%/98%; <i>E. faecalis</i> Merz96, <i>E. faecalis</i> R712 and <i>E. faecalis</i> S613, respectively)
ORF12	9,758	11,383	<i>orf12</i>	28.3	541	63.14	7.5	Hypothetical protein (541 amino acids; 0.0; 99%/99%, <i>E. faecalis</i> EnGen0293); Hypothetical protein (493 amino acids; 0.0; 99%/99%; <i>E. faecalis</i> ATCC 6055); Hypothetical protein (450 amino acids; 0.0; 99%/99%, <i>E. faecalis</i> )



**Figure 6.3.** Antimicrobial activity of the *in vitro*-synthesized EntL50A, EntL50B, EntJSA and EntJSB by the spot-on-agar test using *P. damnosus* CECT4797 (A), *P. acidilactici* 347 (B), and *Lb. buchneri* CECT4674 (C) as the indicator microorganisms. Mixtures of the *in vitro*-synthesized bacteriocins in a 1:1 ratio: EntL50A (1), EntL50B (2), EntJSA (3), EntJSB (4), EntL50A + EntL50B (5), EntL50A + EntJSA (6), EntL50A + EntJSB (7), EntL50B + EntJSA (8), EntL50B + EntJSB (9), EntJSA + EntJSB (10), EntL50A + EntL50B + EntJSA (11), EntL50A + EntL50B + EntJSB (12), EntL50A + EntJSA + EntJSB (13), EntL50B + EntJSA + EntJSB (14), and EntL50A + EntL50B + EntJSA + EntJSB (15).

**Table 6.3.** Antimicrobial activity and synergistic antimicrobial activity of the *in vitro*-synthesized EntL50A, EntL50B, EntJSA, and EntJSB

Antimicrobial activity (BU/ml) <sup>a</sup>			
Bacteriocins	Indicator microorganisms <sup>b</sup>		
	<i>P. damnosus</i> CECT4797	<i>P. acidilactici</i> 347	<i>Lb. buchneri</i> CECT4032
EntL50A	94,413	1,406	25,980
EntL50B	15,173	-	38,579
EntJSA	628	-	750
EntJSB	963	-	14,531
EntL50A + EntL50B	354,207	21,856	65,391
EntL50A + EntJSA	38,000	703	15,200
EntL50A + EntJSB	61,818	25,345	61,692
EntL50B + EntJSA	10,739	-	130,783
EntL50B + EntJSB	7,091	-	33,524
EntJSA + EntJSB	4,697	-	13,858
EntL50A + EntL50B + EntJSA	105,869	21,587	59,759
EntL50A + EntL50B + EntJSB	124,168	24,331	142,961
EntL50A + EntJSA + EntJSB	49,556	10,767	29,429
EntL50B + EntJSA + EntJSB	4,464	-	25,880
EntL50A + EntL50B + EntJSA + EntJSB	113,846	45,240	58,378
Synergism coefficient <sup>c</sup>			
Bacteriocins	Indicator microorganisms <sup>b</sup>		
	<i>P. damnosus</i> CECT4797	<i>P. acidilactici</i> 347	<i>Lb. buchneri</i> CECT4032
EntL50A	-	-	-
EntL50B	-	-	-
EntJSA	-	-	-
EntJSB	-	-	-
EntL50A + EntL50B	3.2	15.5	1.0
EntL50A + EntJSA	0.4	0.5	0.6
EntL50A + EntJSB	0.6	18.0	1.5
EntL50B + EntJSA	0.7	-	3.3
EntL50B + EntJSB	0.4	-	0.6
EntJSA + EntJSB	3.0	-	0.9
EntL50A + EntL50B + EntJSA	1.0	15.4	0.9
EntL50A + EntL50B + EntJSB	1.1	17.3	1.8
EntL50A + EntJSA + EntJSB	0.5	7.7	0.7
EntL50B + EntJSA + EntJSB	0.3	-	0.5
EntL50A + EntL50B + EntJSA + EntJSB	1.0	32.2	0.7

<sup>a</sup> Antimicrobial activity as determined by the MPA. BU, bacteriocin units. Data are means from two independent determinations in triplicate.

<sup>b</sup> *Pediococcus damnosus* 4797 and *Lactobacillus buchneri* 4674 were from the CECT (Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia, Spain). *Pediococcus acidilactici* 347 was from the DNBTA (Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain).

<sup>c</sup> For synergism assays samples of separately *in vitro*-synthesized EntL50A, EntL50B, EntJSA, and EntJSB were mixed in a 1:1 ratio. The synergism coefficient is the ratio calculated dividing the antimicrobial activity of the mixed *in-vitro* synthesized peptides by the sum of the antimicrobial activity of the individual peptides.

(-) No antimicrobial activity or synergism effects detected.

**6.3.4. Purification of the bacteriocins produced by *E. faecalis* DBH18, mass spectrometry analysis, and *de novo* MS-MS peptide mapping.** The bacteriocins from supernatants of *E. faecalis* DBH18 were purified to homogeneity using a previously described chromatographic procedure. A zoomed view by MALDI-TOF MS analysis of the purified bacteriocins, suggest that the spectrum of intact bacteriocins is consistent with the presence in the sample of N-terminal formylated EntJSA and EntJSB. The theoretical monoisotopic  $m/z$  values for these bacteriocins are 5,201.9 and 5,207.8 respectively. The approximate positions in the spectrum of the N-formylated EntL50A and EntL50B are also annotated, as deduced for their theoretical monoisotopic  $m/z$  values of 5,215.3 and 5,203.2, respectively (**Fig. 6.4.**). Furthermore, smaller peaks in the spectrum with monoisotopic  $m/z$  values of 5,218.4 and 5,224.3 could be also tentatively assigned to N-terminal formylated and mono-oxidized forms of EntJSA and EntJSB, respectively, whereas those of 5,220 and 5,232 could be tentatively assigned to N-terminally formylated and oxidized forms of EntL50B and EntL50A, respectively (**Fig. 6.4.**). However, when the purified bacteriocins were digested by trypsin, a significant fraction of the purified peptides remained undigested. Nevertheless, 6 annotated MS/MS spectra from the trypsin-derived digests permitted the *de novo* peptide mapping of precursors IIDWIK ( $m/z$  787.43), FGWPIVK ( $m/z$  846.442), FGWPIFK ( $m/z$  894.451), FGWPIFK ( $m/z$  1022.542), QIMQFIGEGWAINK ( $m/z$  1634.782), and QIMQFIGQGWTIDQIEK ( $m/z$  2035.321) (results not shown). These precursors are specifically derived from the amino acid sequence from EntJSA and EntJSB, and from common amino acid sequences from EntJSA/EntL50A and EntJSB/EntL50B.

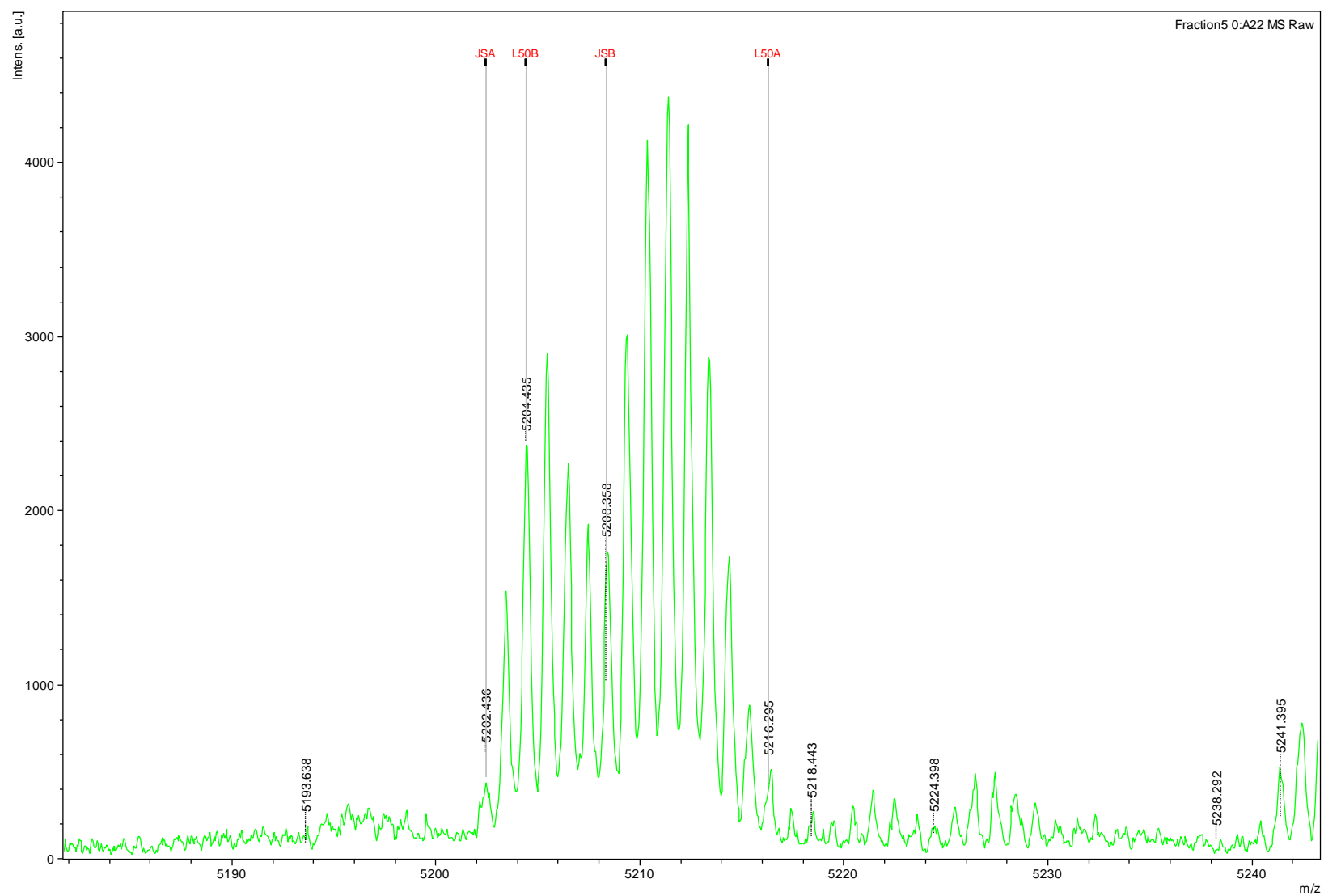
**Table 6.4.** Production of EntL50A and EntL50B in supernatants from *E. faecium* L50 and *E. faecalis* DBH18

Strain	EntL50A production (ng/mg cell dry weight) <sup>a</sup>	EntL50B production (ng/mg cell dry weight) <sup>b</sup>
<i>E. faecium</i> L50	64	68
<i>E. faecalis</i> DBH18	28	470

<sup>a</sup> Bacteriocin production calculated by using a NCI-ELISA with polyclonal antibodies specific for EntL50A.

<sup>b</sup> Bacteriocin production calculated by using a NCI-ELISA with polyclonal antibodies specific for EntL50B.

Data are means from two independent determinations in triplicate



**Figure 6.4.** Zoomed view by MALDI-TOF MS analysis of the purified bacteriocins produced by *E. faecalis* DBH18.

**6.3.5. Bacteriocin production and antimicrobial activity in supernatants from *E. faecalis* DBH18 and *E. faecium* L50.** The production of bacteriocins in supernatants from *E. faecium* L50 and *E. faecalis* DBH18, as determined by using specific anti-EntL50A and anti-EntL50B polyclonal antibodies and a NCI-ELISA, is shown in **Table 6.4.** From these results seems that while EntL50A and EntL50B are produced in similar amounts by *E. faecium* L50, the production of EntL50A was 2.2-fold lower and that of EntL50B was 6.6-fold higher, in *E. faecalis* DBH18 than in *E. faecium* L50. The antimicrobial activity and the inhibitory spectrum of supernatants from *E. faecium* L50 and *E. faecalis* DBH18 were also evaluated against different LAB, food-spoilage and food-borne pathogenic indicator bacteria (**Table 6.5.**). The antimicrobial activity of supernatants from *E. faecalis* DBH18, as compared to that of *E. faecium* L50, was greater against bacteria of the genus *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, and *Enterococcus* but not against those of the genus *Propionibacterium*, *Clostridium*, *Listeria*, and *Staphylococcus*.

## 6.4. DISCUSSION

The *E. faecalis* DBH18 strain was isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*) during evaluation of the hygienic (antimicrobial activity) and safety aspects (virulence factors) related to the presence of enterococci in the intestine and carcasses of wild animal species, profitable for human consumption and available from hunting (Sánchez et al., 2007). As part of the indigenous microflora the bacteriocin-producing *E. faecalis* strains could be highly competitive in food and the gastrointestinal (GI) tract, possibly interfering with colonisation and infection by pathogenic bacteria. Alternatively, enterococcal bacteriocins produced by heterologous hosts or used as purified preparations could have potential therapeutical applications.

In this study, PCR-amplification of purified genomic DNA from *E. faecalis* DBH18 identified a 468-bp fragment, derived from *efl097* (GenBank AAO80897), encoding the high molecular mass (14,831.8 Da) bacteriocin EntV583 from *E. faecalis* V583 (Swe et al., 2007). Fragments of the same length were also identified in other *E. faecalis* strains (DBC5, DCH9, DAC10, DBC16, DCC32, DAC9, DBH9, DBC4, and DEC23) isolated from Mallard ducks (data not shown). The presence of *efl097* in most *E. faecalis* strains permits to speculate that large class IV bacteriocins may be more prevalent than suspected in enterococci. However, the nucleotide sequence of *efl097* from *E. faecalis* DBH18 revealed one G to A replacement leading to a translation termination codon at position 99 of the predicted mature 136-amino-acid length EntV583. It is possible that this premature stop codon may be responsible for an attenuated antagonistic phenotype in *E. faecalis* DBH18. Nevertheless, the expression of *efl097* is usually tightly regulated in enterococci together with that of genes encoding other known virulence factors, suggesting that production of EntV583 may be also related to virulence (Bourgogne et al., 2006; Swe et al., 2007).

**Table 6.5.** Antimicrobial activity and inhibitory spectrum of supernatants from *E. faecalis* DBH18 and *E. faecium* L50<sup>a</sup>

Indicator strain	Source <sup>b</sup>	Supernatants	
		<i>E. faecalis</i> DBH18	<i>E. faecium</i> L50
<i>Lb. reuteri</i> 20016	DSM	2,049	610
<i>Lb. helveticus</i> 15009	ATCC	2,255	490
<i>Lb. casei</i> 334	ATCC	4,760	2,416
<i>Lb. bulgaricus</i> 11842	ATCC	2,425	375
<i>Lb. acidophilus</i> 4356	ATCC	1,681	2,186
<i>Lb. sakei</i> 2714	NCFB	1,188	378
<i>L. lactis</i> BB24	DNBTA	987	-
<i>P. acidilactici</i> 347	DNBTA	5,740	2,980
<i>P. pentosaceus</i> FBB61	TNO	5,603	3,202
<i>E. faecium</i> P13	DNBTA	6,683	4,552
<i>E. faecium</i> L50	DNBTA	2,279	-
<i>E. faecium</i> T136	DNBTA	7,194	4,734
<i>E. faecalis</i> INIA4	INIA	4,072	3,677
<i>E. faecalis</i> P4	IFR	1,270	798
<i>E. faecalis</i> P36	IFR	1,297	2,349
<i>Propionibacterium</i> sp. P4	NCDO	1,085	2,140
<i>Propionibacterium</i> sp. P6	NCDO	865	1,586
<i>P. acidipropionici</i> 563	NCDO	792	2,045
<i>C. tyrobutiricum</i> 1754	NCDO	712	-
<i>C. perfringens</i> 376	CECT	1,586	1,188
<i>C. botulinum</i> 551	CECT	1,282	3,343
<i>L. monocytogenes</i> 911	CECT	720	3,234
<i>L. monocytogenes</i> 932	CECT	1,308	2,846
<i>L. monocytogenes</i> 935	CECT	1,180	4,264
<i>L. monocytogenes</i> 4031	CECT	882	2,911
<i>L. monocytogenes</i> 4032	CECT	1,024	3,442
<i>L. ivanovii</i> 913	CECT	902	5,114
<i>L. seeligeri</i> 917	CECT	1,743	4,143
<i>L. welshimeri</i> 919	CECT	607	2,615
<i>L. grayi</i> 931	CECT	1,206	2,615
<i>S. aureus</i> 137	FRI	487	3,316
<i>S. aureus</i> 196E	FRI	595	2,985
<i>S. aureus</i> 361	FRI	522	3,294
<i>S. aureus</i> 472	FRI	685	2,735
<i>Ps. fluorescens</i> 378	CECT	-	-
<i>Brocothrix thermosphacta</i> 847	CECT	-	-

<sup>a</sup> Area of the halos of inhibition by the ADT and expressed in mm<sup>2</sup>/mg cell dry weight. Data are means from two independent determinations in triplicate.

<sup>b</sup> Abbreviations: ATCC, American Type Culture Collection (Rockville, USA); CECT, Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, Spain); DNBTA, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid (Madrid, Spain); DSM, Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zell Kulturen (GmbH, Braunschweig, Germany); FRI, Food Research Institute (Madison, USA); IFR, Institute of Food Research (Norwich, UK); INIA, Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (Madrid, Spain); NCDO, National Collection of Dairy Organisms (Reading, UK); NCFB, National Collection of Food Bacteria (Reading, UK); TNO, Nutrition and Food Research (Zeist, The Netherlands).  
(-) No antimicrobial activity detected.

The PCR-amplification and sequencing of purified genomic DNA from *E. faecium* L50 and *E. faecalis* DBH18, determined that *E. faecalis* DBH18 encodes a 286-bp fragment identical to *entL50A-entL50B* from *E. faecium* L50, and a 132-bp fragment (*entJSB*), highly

similar but not identical to *entL50B* from *E. faecium* L50 (**Fig. 6.1.**). Enterocin L50, produced by *E. faecium* L50, is an early identified two-peptide (EntL50A and EntL50B), leaderless bacteriocin (Cintas et al., 1998). Bacteriocins identical to EntL50 are encoded by *E. durans* (Batdorj et al., 2006) and *E. faecium* strains of different origin (Izquierdo et al., 2008; Strompfová et al., 2008; Brandão et al., 2010; Ahmadova et al., 2013). However, nested PCR experiments suggest that *entL50A-entL50B* may be in a different location in *E. faecalis* DBH18 and *E. faecium* L50 (**Fig. 6.2.**). The *entL50A-entL50B* genes are located in the 50-kb plasmid pCIZ1 of *E. faecium* L50 (Cintas et al., 1998; Cintas et al., 2000; Criado et al., 2006c), in a 22-kb plasmid in *E. faecium* F58 (Achemechen et al., 2005) and in the 21-kb plasmid pEF1 of *E. faecium* 6T1a (Ruíz-Barba et al., 2007), although the plasmid-less strain of *E. faecium* BFE1072 and the plasmid-cured strain of *E. faecium* B2 also produces EntL50 (Moreno et al., 2002). The wide distribution of *entL50A-entL50B* in *Enterococcus* spp. may be due to their remarkable survival in a wide range of ecological niches and their superior genetic exchange mechanisms (Izquierdo et al., 2008). Accordingly, further studies would be performed towards identification of genes adjacent to *entL50A-entL50B* in *E. faecalis* DBH18, which may contribute to the processing and secretion of the produced bacteriocins and/or to their mobilization and transfer among the enterococci.

PCR-amplification of fragments deduced from the nucleotide sequence of *entJSB* and new primers, designed by primer walking permitted the determination, by inverse-PCR, of a DNA sequence of 11,456-bp in *E. faecalis* DBH18 with 12 putative open reading frames (ORFs) (**Table 6.2.**). Two of the ORFs with the *entL50A-entL50B*-like sequence (termed *entJSA* and *entJSB*) encode two peptides, EntJSA and EntJSB, homologous to EntL50A and EntL50B produced by *E. faecium* L50 (Cintas et al., 1998; Cintas et al., 2000). A BLAST nucleotide sequence homology search revealed that *entJSA* and *entJSB* were identical to *entNA* and *entNB* (100% identity, GenBank AB292312) from *E. faecalis* N1-33, isolated from fermented vegetables and showed a high similarity with *mr10A* and *mr10B* (99% identity, GenBank DQ366596) from *E. faecalis* MRR 10-3, isolated from the uropygial gland of the hoopoe (*Upupa epops*) (Martín-Platero et al., 2006), with genes encoding the bacteriocin ESL-5 produced by *E. faecalis* SL-5, isolated from human feces (Kang et al., 2009), and with *ent7A* and *ent7B* from *E. faecalis* 710C, isolated from ground beef (Liu et al., 2011). The *entJSA-entJSB* homology was slightly lower with *entL50A* and *entL50B* (92% identity, GenBank AJ223633) from *E. faecium* L50, isolated from fermented sausages (Cintas et al., 1998), with *entI* and *entJ* (92% identity, GenBank DQ198088) from *E. faecium* 6T1a, isolated from olive fermentations (Floriano et al., 1998) and with *ent62-A* and *ent62-B* (93% identity, GenBank EF112398) from a vaginal strain of *E. faecium* 62-6 (Dezwaan et al., 2007). Nevertheless, the deduced amino acid sequence of EntJSA was identical to that of EntMR10A, EntNA, BacESL-5 and Ent7A with replacement of D by E at position 38 of their peptide sequence, whereas that of EntJSB was identical to those of EntMR10B, EntNB, BacESL-5 and Ent7B with replacement of residues, A by T and L by F, at positions 9 and 15, respectively, of their amino acid sequence (**Fig. 6.5.**).



(A).

Similarities between the described *entL50A-entL50B*-like sequences

Enterocin	Sequence	Identity (%)	<i>Enterococcus</i> spp.
EntJSA-EntJSB	<i>entJSA-entJSB</i>	100	<i>E. faecalis</i> DBH18
EntNA-EntNB	<i>entNA-entNB</i>	100	<i>E. faecalis</i> N1-33
EntMR10A-EntMR10B	<i>entMR10A-entMR10B</i>	99	<i>E. faecalis</i> MRR 10-3
Bacteriocin ESL-5	<i>bacESL-5</i>	99	<i>E. faecalis</i> SL-5
Ent7A-Ent7B	<i>ent7A-ent7B</i>	99	<i>E. faecalis</i> 710C
EntL50A-EntL50B	<i>entL50A-entL50B</i>	93	<i>E. faecium</i> IT62
Ent62-6A-Ent62-6B	<i>ent62-6A-ent62-6B</i>	93	<i>E. faecium</i> 62-6
EntL50A-EntL50B	<i>entL50A-entL50B</i>	92	<i>E. faecium</i> L50
EntJ-EntI	<i>entJ-entI</i>	92	<i>E. faecium</i> 6T1a

(B).

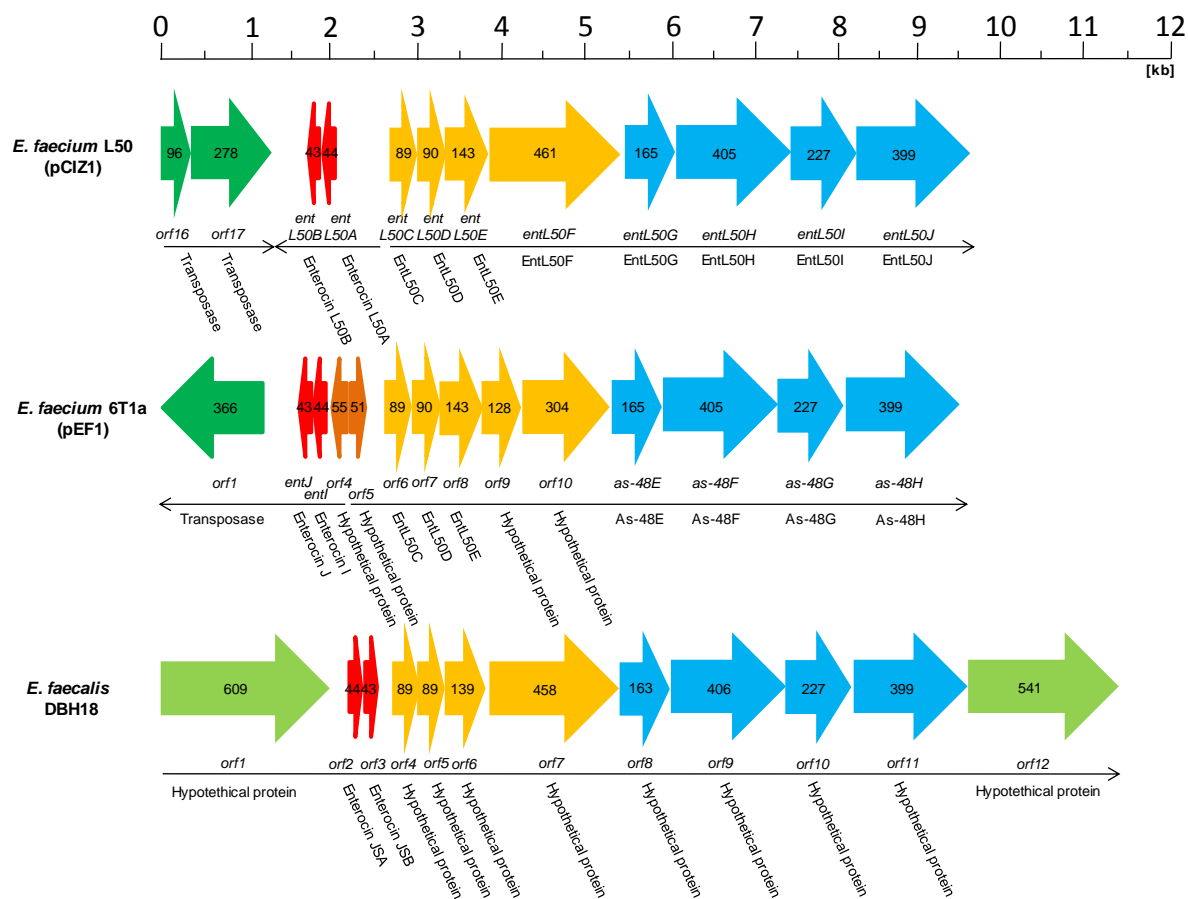
Enterocin JSA/MR10A/NA/SL-5/7A :	MGAI AKLVAKFGWP IVKKYYKQIMQFIGEGWAINKIIDWIKKHI
Enterocin L50A :	MGAI AKLVAKFGWP IVKKYYKQIMQFIGEGWAINKIIEWIKKHI
Enterocin JSB/MR10B/NB/SL-5/7B :	MGAI AKLVAKFGWP I KKFYKQIMQFIGQGWTIDQIEKWLKRH
Enterocin L50B :	MGAI AKLVTKFGWP LIKKFYKQIMQFIGQGWTIDQIEKWLKRH

**Figure 6.5.** Similarity between the described *entL50A-entL50B*-like sequences (A). Deduced amino acid sequence of the EntL50A-EntL50B-like leaderless bacteriocins (B). EntJSA is identical to EntMR10A, EntNA, BacESL-5 and Ent7A with replacement of residue D by E at position 38 of their amino acid sequences. EntJSB is identical to EntMR10B, EntNB, BacESL-5 and Ent7B with replacement of residues A by T and L by F at positions 9 and 15, respectively, of their amino acid sequences.

Most importantly, in *E. faecalis* DBH18 and in close vicinity, in the same frame and in the same transcription orientation than *entJSA-entJSB*, ten putative ORFs were determined. Upstream to *entJSA-entJSB* the product of ORF1 (*orf1*) shows high level of identity with staphopain C47, a staphylococcal peptidase of the group of the cysteine proteases. Some of these proteases are used by pathogenic bacteria to degrade proteins of the host's innate immune system, to spread and cause infection and also detected into mobile genetic elements as a mechanism for dissemination of such proteases in bacteria of the human microbiota (Thornton et al., 2010). In *E. faecalis* DBH18, the proximity of *orf1* to the *entJS* gene cluster would argue for a common mechanism of transfer. Downstream to *entJSA-entJS* nine ORFs were found (**Table 6.2.**). The first three ORFs (*orf4*, *orf5* and *orf6*) show high level of amino acid similarity with proteins encoded by *orfE*, *orfF* and *orfG* (Cintas et al., 1998) and with *orf20*, *orf21* and *orf22* from pCIZ1, the enterococcal plasmid encoding *entL50A-entL50B* from *E. faecium* L50 (Criado et al., 2006c), and with *orf6*, *orf7* and *orf8* from pEF1, the enterococcal plasmid encoding *entI-entJ* from *E. faecium* 6T1a (Ruiz-Barba et al., 2007) (**Fig. 6.6.**). Search analysis revealed no significant homologies of the 88-, 89- and 139-amino-acid proteins encoded by *orf4*, *orf5* and *orf6* to any protein in data banks. However, *orf7* encoding a putative 458-amino acid putative membrane protein show sequence similarities with *orf9* and *orf10* encoding a 128- and 134-amino-acid hypothetical proteins by *E. faecium* 6T1a and by *orf23*, encoding a 461-amino-acid hypothetical membrane protein by *E. faecium* L50 (**Fig. 6.6.**). In *E. faecalis* DBH18 the genes *orf8*, *orf9*, *orf10* and *orf11* encodes the hypothetical 163-, 406-, 227- and 399-amino acid proteins that shows high homology with the multicomponent ABC transporter with three subunits (two transmembrane subunits and the ATPase subunit) and an accessory protein, as described in pCIZ1 (Criado, 2006c), with the ABC transporter *as-48EFGH* from *E. faecalis* S-48 involved in producer self-protection against enterocin AS-48 (EntAS-48) (Díaz et al., 2003), and with the putative ABC transporter comprising genes *orf11* to *orf14* in plasmid pEF1 (Ruiz-Barba et al., 2007) (**Fig. 6.6.**).

From identification of the *entJSA-entJSB* gene cluster from *E. faecalis* DBH18 (**Fig. 6.6.**) it could be hypothesized, as previously suggested for EntL50 (Criado et al., 2006c), that the putative ABC transporter encoded by *orf8* to *orf11* could be involved in both secretion of and immunity to EntJSA and EntJSB by active extrusion of the bacteriocin peptides out of the producer cells. However, the genes *as-48EFGH* from *E. faecalis* S-48, producer of the cyclic bacteriocin enterocin AS-48 (EntAS-48), and highly homologous to *orf8* to *orf11* were determined to encode a secondary ABC transporter involved in partial self-protection against EntAS-48 (Díaz et al., 2003). Furthermore, deletion of *garFGH* a putative ABC transporter in the gene cluster likely involved in the production of and immunity to garvicin ML (GarML), a cyclic bacteriocin produced by *Lactococcus garvieae* DCC43 and highly similar to *as-48EFGH* and to *orf8* to *orf11* from *E. faecalis* DBH18, had no effect on sensitivity to or production of GarML (Gabrielsen et al., 2014). Furthermore, none of the ORFs at the *orf4* to *orf7* loci of *E. faecalis* DBH18 shows similarity to single multidrug resistance (MDR) transporter proteins shown to be involved in both secretion of and immunity to bacteriocins LsbB (Gajic et al., 2003) and enterocin Q (Criado et al., 2006a). However, genes *orf4* to *orf7*, downstream to and in the same orientation as *entJSA-entJSB*, show similarities to those

involved in secretion of and immunity to the leaderless bacteriocins aureocin A53 (Santos et al., 2012), epidermicin (Sandiford and Upton, 2012) and lacticin Q (Iwatani et al., 2012). A functional analysis of the *entJSA-entJSB* gene cluster, outside of the scope of the present study, is warranted and will clarify the role of each protein in export of and immunity to the bacteriocins EntJSA and EntJSB.



**Figure 6.6.** Genetic organization of gene clusters encoding *entL50A-entL50B* and *entL50A-entL50B*-like genes in *E. faecium* L50, *E. faecium* 6T1a and *E. faecalis* DBH18. Genes are indicated as follows: intense green, insertion sequences; red, genes encoding bacteriocins EntL50 (*entL50A* and *entL50B*), enterocin I (*entI* and *entJ*) and enterocin JSA (*entJSA* and *entJSB*), respectively; yellow-brown, hypothetical proteins; light green, hypothetical proteins from *E. faecalis*; blue, genes possibly encoding a putative ABC transporter complex. Numbers refer to number of amino acids in encoded proteins.

The antimicrobial activity associated to *entJSA* and *entJSB* encoded by *E. faecalis* DBH18 was determined by an *in vitro* combined transcription/translation assay. The *in vitro* synthesized EntJSA and EntJSB displayed antimicrobial activity with different sensitivities against three bacterial indicators, suggesting that *entJSA* and *entJSB* are the minimum requirements for production and biological activity of EntJSA and EntJSB, respectively, and that these peptide products are not posttranslationally modified (Table 6.3.). In this study, EntJSB displayed a higher antimicrobial activity than EntJSA whereas the activity of the individual bacteriocins was lower than that of EntL50A and EntL50B. However, it has been previously reported that EntL50A is more active than EntL50B (Cintas et al., 1998; Izquierdo

et al., 2008). The synergistic effect of EntL50A-EntL50B and that of EntJSA-EntJSB was also observed, although the antimicrobial activity of the former bacteriocins was higher than the latter. Mixtures containing the four EntL50A, EntL50B, EntJSA and EntJSB bacteriocins also displayed a significant antimicrobial activity (**Table 6.3.**).

The use of polyclonal antibodies of predetermined activity against EntL50A and EntL50B and a specific ELISA has permitted the detection and quantification of EntL50 (EntL50A and EntL50B) and EntJS (EntJSA and EntJSB) in supernatants from *E. faecium* L50 and *E. faecalis* DBH18, respectively (**Table 6.4.**). The antibodies were selected for reactivity against residues 32 to 44 and residues 32 to 43 of the C-terminal amino acid sequence of EntL50A and EntL50B, respectively (Criado et al., 2006b). The replacement of E by D in residue 38 from EntJSA could account for the lower recognition of EntJSA by the anti-EntL50A antibodies. On the other hand, the replacement of two amino acid residues (at residues 9 and 15) from EntJSB, would not affect the recognition of both peptides by the anti-EntL50B antibodies. Accordingly, the similar production of EntL50A and EntL50B by *E. faecium* L50 (**Table 6.4.**), would confirm that both peptides are transcribed from a single transcription unit (Cintas et al., 1998). However, the production of EntL50A was lower in *E. faecalis* DBH18 than in *E. faecium* L50, whereas the production of EntL50B (comprising EntL50B and EntJSB) was higher in the former than in the latter. Only a single amino acid substitution dictates the difference between high and poor protein secretion yields in *Bacillus subtilis* (Nijland et al., 2007). Thus, is possible that differences in the sequence of EntJSB as compared to EntL50B, could permit a more efficient secretion of EntJSB by *E. faecalis* DBH18. Moreover, the observation that *E. faecalis* DBH18 produces EntL50A and EntL50B (comprising EntL50B and EntJSB) is very interesting since previous results revealed that *E. faecium* DCH2 and *E. faecium* DCC14, encoding *entL50A-entL50B* and *entA* were silent for production of either EntL50A, EntL50B or enterocin A (EntA) (Sánchez et al., 2007).

MALDI-TOF MS analysis of purified bacteriocins, produced by *E. faecalis* DBH18, permitted determination of the discrepancy between the theoretical monoisotopic m/z values deduced from the purified enterocins and their measured values, surely due to the presence of N-terminal formylmethionine (fMet) in their primary sequences (**Fig. 6.4.**). It has been reported that most, if not all, leaderless bacteriocins including EntL50A and EntL50B, Ent7A and Ent7B, lactacin Q and others (Fujita et al., 2007; Izquierdo et al., 2008; Liu et al., 2011), contain an N-terminal fMet residue and that deformylation of fMet is likely prevented (Liu et al., 2011). Small peaks in the MALDI-TOF MS spectrum could also be assigned to mono-oxidized forms of the purified enterocins, with the sites of oxidation tentatively assigned at the N-terminal fMet (Liu et al., 2011) or at Met24 (Izquierdo et al., 2008) (**Fig. 6.4.**). In both cases, this oxidation process is reversible because methionine sulfoxide reductase (MSR), an enzyme present in all living organisms, can reduce methionine sulfoxide to methionine (Liu et al., 2011). Furthermore, the annotated MS/MS spectra of trypsin-derived digests from the purified bacteriocins produced by *E. faecalis* DBH18 permitted the *de novo* peptide mapping of precursors IIDWIK, FGWPFIK and FGWPFIKK, specifically derived from EntJSA and EntJSB and precursors FGWPIVK, QIMQFIGEGWAINK and QIMQFIGQGWTIDQIEK,

derived from the common amino acid sequences from EntJSA/EntL50A and EntJSB/EntL50B.

The antimicrobial activity of supernatants from *E. faecalis* DBH18, as compared to that of *E. faecium* L50, was higher against some indicator bacteria including other LAB, *Enterococcus* spp., *Propionibacterium* spp., *Clostridium* spp., *Listeria* spp. and *Staphylococcus* spp., but not to others (**Table 6.5.**). This may be explained since sensitivity of indicator bacteria to enterocins is variable between different mixtures (**Table 6.3.**). It may also be speculated that bacteriocin folding, bacteriocin aggregation, different sensitivities of the enterocins to proteinase attack, production of additional and yet unknown enterocins and yet, other undescribed events, may account for the different antimicrobial activity of *E. faecalis* DBH18 as compared to that of *E. faecium* L50.

This study reports that *E. faecalis* DBH18 produces bacteriocins, synthesized by *E. faecium* and *E. faecalis* confirming that enterocins may be widespread in enterococci and not related to the species and/or origin of the producer strain (Izquierdo et al., 2008). Furthermore, besides being active against spoilage microorganisms and foodborne pathogens including *Listeria* and *Clostridium* spp., bacteriocins identical to those produced by *E. faecalis* DBH18, such as enterocin7A and Ent7B, are active against the Gram-negative *Brevindomonas diminuta*, associated with infections among immune-suppressed cancer patients (Liu et al., 2011). Similarly, EntMR10A and EntMR10B may help the Hoopoe (*Upupa epops*) to defend itself against infection by opportunistic bacteria and pathogenic bacteria (Martín Platero et al., 2006). Furthermore, bacteriocins with a broader antimicrobial spectrum including EntMR10A and EntMR10B, prevail in enterococcal symbionts isolated from the hoopoe's uropygial gland, further suggesting that this capacity should be under selection (Ruíz-Rodríguez et al., 2013). Supernatants from *E. faecalis* SL-5, producer of bacteriocin SL-5, are active against *Propionibacterium acnes* a key factor in the pathogenesis of acne vulgaris and with a potential role to the treatment of acne as an alternative to topical antibiotics (Kang et al., 2005).

To date seven natural nisin variants have been discovered including nisin A, F, Q, U, U2, Z and nisin P, which is encoded on nisin operons present in both *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus* and *Streptococcus suis* (Field et al., 2012; Wu et al., 2014). Since nisin variants show until ten different amino acids in their peptide sequence and large differences in the genetic organization of their gene clusters, it seems reasonable that from the small differences in their nucleotide and amino acid sequence and the organization of the gene cluster for *entJSA-entJSB*, as compared to that *entL50A-entL50B* (**Fig. 6.6.**), the *entJSA-entJSB* genes described in this work and producers of EntJSA and EntJSB (**Table 6.3.**) should be considered as genetic variants of *entL50A-entL50B*. Furthermore, to avoid lengthening the number of bacteriocins with identical amino acid sequences and referred as EntJS (EntJSA and EntJSB), EntMR10 (EntMR10A and EntMR10B), EntN (EntA and EntB), Bac SL-5 (BacSL-5A and BacSL5-B) and Ent7 (Ent7A and Ent7B), produced by *E. faecalis* strains from different sources, the genes *entJSA-entJSA* perhaps would be renamed as *entL50VC-entL50VD* and their gene products as EntL50V1 (EntL50VC and EntL50VD).

We have recently reported the implication of the gelatinase (GelE), produced by *E. faecalis* DBH18, in the production bioactive peptides with high angiotensin converting enzyme-inhibitory activity (ACE-IA), antihypertensive and antioxidant activities (Gútiérrez et al., 2013; Gutiérrez et al., 2014). Studies are in progress by our research group to engineer safer LAB and other microbial hosts as heterologous producers of GelE to investigate the biotechnological, medical and veterinary applications of bioactive peptides derived from the GelE-mediated fermentation and/or hydrolysis of different food substrates. Differently to *E. faecalis* 710C, producer of Ent7A and Ent7B (Liu et al., 2011), *E. faecalis* DBH18 does not encode virulence factors such as *cylLMAB* (bacteriocin-hemolysin cytotoxin), *esp* (enterococcal surface protein), *enlA* (enterolysin A), *asaI* (aggregation substance), and *cob* (sex pheromone) and thus, may be considered safer than other enterococcal strains (Sánchez et al., 2007; Gutiérrez et al., 2013). Similarly, the enterocins EntL50 and EntJS, encoded and produced by *E. faecalis* DBH18, may find potential applications as, partially purified or purified to homogeneity, natural antimicrobial agents in food, feed, pharmaceutical, veterinary, and medical applications.

Further unique features that may distinguish leaderless bacteriocins from other peptide bacteriocins include remarkable protease stability and a defined, rigid structure in aqueous solution (Netz et al., 2002). Unlike most other bacteriocins, which exhibit random coil conformations in water, the leaderless Ent7A and Ent7B are highly structured in aqueous conditions. Furthermore, both peptides are primarily  $\alpha$ -helical, adopting a similar overall fold and the overall structures bear an unexpected resemblance to carnocyclin A, a 60-residue cyclic bacteriocin (Lohans et al., 2013). Further efforts to determine the production, immunity, secretion, heterologous production, and mobilization of the Sec-dependent EntV583 and the leaderless EntL50 and EntJS bacteriocins, produced by *E. faecalis* DBH18, constitutes an attractive scientific challenge in food microbiology, public health, and the bacteriocin-research field. EntJSA and EntJSB may be further used to evaluate the role of amino acid substitutions in the antimicrobial activity, structural conformation and synergistic effects of enterocins.

## 6.5. ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Morten Skaugen from the Proteomics Core Facility of the Norwegian University of Life Sciences (NMBU), Ås (Norway) for his help with the MALDI-TOF/MS equipment and data analysis. This work was supported by Project AGL2012-34829 from the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), Project AGL2009-08348 from the Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) and by Grants S2013/ABI-2747 and S2009/AGR-1489 from the Comunidad de Madrid (CAM). J. Sánchez held a fellowship from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (MECD), J. Borrero held a research contract from the Comunidad de Madrid (CAM), and J.J. Jiménez was the recipient of a fellowship from the MICINN, Spain.

## 6.6. REFERENCES

- Achemchem, F., Martínez-Bueno, M., Abrini, J., Valdivia, E. and Maqueda, M. (2005). *Enterococcus faecium* F58, a bacteriocinogenic strain naturally occurring in Jben, a soft, farmhouse goat's cheese made in Morocco. *J. Appl. Microbiol.* 99:141-150.
- Ahmadova, A., Todorov, S.D., Choiset, Y., Rabesona, H., Zadi, T.M., Kuliyeu, A., de Melo Franco, B.D.G., Chobert, J.M. and Hartlé, T. (2013). Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. *Food Cont.* 30:631-641.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Batdorj, B., Dalgalarondo, M., Choiset, Y., Pedroche, J., Métro, F., Prévost, H., Chobert, J.M. and Hartle, T. (2006). Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. *J. Appl. Microbiol.* 101:837-848.
- Borrero, J., Jiménez, J.J., Gútiez, L., Herranz, C., Cintas, L.M. and Hernández, P.E. (2011a). Use of the *usp45* lactococcal signal sequence to drive the secretion and functional expression of enterococcal bacteriocins in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89:131-143.
- Borrero, J., Jiménez, J.J., Gútiez, L., Herranz, C., Cintas, L.M. and Hernández, P.E. (2011b). Protein expression vector and secretion signal peptide optimization to drive the :acid bacteria. *J. Biotechnol.* 156:76-86.
- Borrero, J., Brede, D.A., Skaugen, M., Diep, D.B., Herranz, C., Nes, I.F., Cintas, L.M. and Hernández, P.E. (2011c). Characterization of garvicin ML, a novel circular bacteriocin produced by *Lactococcus garvieae* DCC43, isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Appl. Environ. Microbiol.* 77:369-373.
- Borrero, J., Kunze, G., Jiménez, J.J., Böer, E., Gútiez, L., Herranz, C., Cintas, L.M. and Hernández, P.E. (2012). Cloning, production and functional expression of the bacteriocin enterocin A, produced by *Enterococcus faecium* T136, by the yeasts *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha* and *Arxula adeninivorans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:5956-5961.
- Bourgogne, A., Hilsenbeck, S.G., Dunny, G.M. and Murray, B.E. (2006). Comparaison of OG1RF and a isogenic *fsrB* deletion mutant by transcriptional analysis: the Fsr system of *Enterococcus faecalis* is more than the activator of gelatinase and serine protease. *J. Bacteriol.* 188:2875-2884.
- Brandão, A., Almeida, T., Muñoz-Atienza, e., Torres, C., Igrejas, G., Hernández, P.E., Cintas, L.M., Poeta, P. and Herranz, C. (2010). Antimicrobial activity and occurrence of bacteriocin structural genes in *Enterococcus spp.* of human and animal origin isolated in Portugal. *Arch. Microbiol.* 192:927-936.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Holo, H., Hernández, P.E., Nes, I.F. and Håvarstein, L.S. (1998). Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.* 180:1988-1994.

- Cintas, L.M., Casaus, P., Herranz, C., Håvarstein, L.S., Holo, H., Hernández, P.E. and Nes, I.F. (2000). Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the *sec*-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.* 182:6806-6814.
- Cotter, P.D., Hill and C., Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Rev. Microbiol.* 3:777-788.
- Criado, R., Diep, D., Aakra, Å, Gutiérrez, J., Nes, I.F., Hernández, P.E. and Cintas, L.M. (2006a). The complete sequence of the enterocin Q-encoding plasmid pCIZ2 from the multiple bacteriocin producer *Enterococcus faecium* L50 and genetic characterization of enterocin Q production and immunity. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:6653-6666.
- Criado, R., Gutiérrez, J., Martín, M., Herranz, C., Hernández, P.E. and Cintas, L.M. (2006b). Immunochemical characterization of temperature-regulated production of enterocin L50 (EntL50A and EntL50B), enterocin P and enterocin Q by the multiple bacteriocin producer strain *Enterococcus faecium* L50. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:7634-7643.
- Criado, R. (2006c). Caracterización genética e inmunoquímica de la producción de enterocinas L50, P y Q por *Enterococcus faecium* L50. Secuencia nucleotídica y análisis funcional de los plásmidos pCIZ1 y pCIZ2. Ph.D. Thesis, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain.
- Dezwaan, D.C., Mequio, M.J., Littell, J., Allen, J.P., Rossbach, S. and Pybus, V. (2007). Purification and characterization of enterocin 62-6, a two-peptide bacteriocin, produced by a vaginal strain of *Enterococcus faecium*: Potential significance in bacterial vaginosis. *Microb. Ecol. Health Dis.* 19:241-250.
- Diaz, M., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., Fernández, M., Santos Soler-González, A., Ramírez-Rodrigo, H. and Maqueda, M. (2003). Characterization of a new operon, *as-48EFGH*, from the *as-48* gene cluster involved in immunity to enterocin AS-48. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1229-1236.
- Dobson, A., Cotter, P.D., Ross, R.P. and Hill, C. (2012). Bacteriocin production: a probiotic trait? *Appl. Environ. Microbiol.* 78:1-6.
- Driessen, A.J.M. and Nouwen, N. (2007). Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu. Rev. Biochem.* 77:1-25.
- Field, D., Begley, M., O'Connor, P.M., Daly, K.M., Hugenholtz, F., Cotter, P.D., Hill, C. and Ross, R.P. (2012). Bioengineered nisin A derivatives with enhanced activity against both Gram positive and gram negative pathogens. *PLoS ONE* 7(10): e46884. doi:10.1371/journal.pone.004684.
- Floriano, B., Ruíz-Barba, J.L. and Jiménez-Díaz, R. (1998). Purification and genetic characterization of enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4883-4890.
- Franz, C.M.A.P., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W. and Gálvez, A. (2011). Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 151:125-140.
- Franz, C.M.A.P., van Belkum, M.J., Holzapfel, W.H., Abriouel, H. and Gálvez, A. (2007). Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol. Rev.* 31:293-310.



- Fujita, K., Ichimasa, S., Zendo, T., Koga, S., Yoneyama, F., Nakayama, J. and Sonomoto, K. (2007). Structural analysis and characterization of lacticin Q, a novel bacteriocin belonging to a new family of unmodified bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:2871-2877.
- Gabrielsen, C., Brede, D.A., Salehian, Z., Nes, I.F. and Diep, D.B. (2014). Functional genetic analysis of the garML gene cluster in *Lactococcus garvieae* DCC43 gives new insights into circular bacteriocin biosynthesis. *J. Bacteriol.* 196:911-919.
- Gajic, O., Buist, G., Kojic, M., Topisirovic, L., Kuipers, O.P. and Kok, J. (2003). Novel mechanism of bacteriocin secretion and immunity carried out by lactococcal multidrug resistance proteins. *J. Biol. Chem.* 278:34291-34298.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R.L. and Omar, N.B. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 120:51-70.
- Gútiéz, L., Borrero, J., Jiménez, J.J., Gómez-Sala, B., Recio, I., Cintas, L.M., Herranz, C. and Hernández, P.E. (2014). Genetic and biochemical evidence that recombinant *Enterococcus* spp. strains expressing gelatinase (GelE) produce bovine milk-derived hydrolysates with high angiotensin converting enzyme-inhibitory activity (ACE-IA). *J. Agric. Food Chem.* (in press).
- Gútiéz, L., Gómez-Sala, B., Recio, I., del Campo, R., Cintas, L.M., Herranz, C. and Hernández, P.E. (2013). *Enterococcus faecalis* strains from food, environmental, and clinical origin produce ACE-inhibitory peptides and other bioactive peptides during growth in bovine skim milk. *Int. J. Food. Microbiol.* 166:93-101.
- Håvarstein, L.S., Diep, D.B. and Nes, I.F. (1995). A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol. Microbiol.* 16:229-240.
- Hyink, O., Balakrishnan, M. and Tagg, J.R. (2005). *Streptococcus rattus* strain BHT produces both a class I two-component lantibiotic and a class II bacteriocin. *FEMS Microbiol. Lett.* 252:235-241.
- Iwatani, S., Yoneyama, F., Miyashita, S., Zendo, T., Nakayama, J. and Sonomoto, K. (2012). Identification of genes involved in the secretion and self-immunity of lacticin Q, an unmodified leaderless bacteriocin from *Lactococcus lactis* QU 5. *Microbiology* 157:2927-2935.
- Iwatani, S., Zendo, T., Yoneyama, F., Nakayama, J. and Sonomoto, K. (2007). Characterization and structure analysis of a novel bacteriocin, lacticin Z, produced by *Lactococcus lactis* QU 14. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71:1984-1992.
- Izquierdo, E., Bednarczyk, A., Schaeffer, C., Cai, Y., Marchioni, E., Van Dorselaer, A. and Ennahar, S. (2008). Production of enterocins L50A, L50B, and IT, a new enterocin, by *Enterococcus faecium* IT62, a strain isolated from Italian ryegrass in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:1917-1923.
- Jiménez, J.J., Borrero, J., Diep, D.B., Gútiéz, L., Nes, I.F., Herranz, C., Cintas, L.M. and Hernández, P.E. (2013). Cloning, production and functional expression of the bacteriocin sakacin A (SakA) and two SakA-derived chimeras in lactic acid bacteria (LAB) and the yeasts *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40:977-993.

- Jiménez, J.J., J. Borrero, J., Gútiez, L., Arbulu, S., Herranz, C., Cintas L.M., and Hernández, P.E. (2014). Use of synthetic genes for cloning, production and functional expression of the bacteriocins enterocin A and bacteriocin E 50-52 by *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Biotechnol.* 56:571-583.
- Kang, B.S., Seo, J.G., Lee, G.S., Kim, J.H., Kim, S.Y., Han, Y.W., Kang, H., Kim, H.O., Rhee, J.H., Chung, M.J. and Park, Y.M. (2009). Antimicrobial activity of enterocins from *Enterococcus faecalis* SL-5 against *Propionibacterium acnes*, the causative agent in acne vulgaris, and its therapeutic effect. *J. Microbiol.* 47:101-109.
- Khan, H., Flint, S. and Yu, P.L. (2010). Enterocins in food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 141:1-10.
- Kjos, M., Borrero, J., Opsata, M., Birri, D.J., Holo, H., Cintas, L.M., Snipen, L., Hernández, P.E., Nes, I.F. and Diep, D.B. (2011). Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Microbiol.* 157:3256-3267.
- Liu, X., Vederas, J.C., Whittall, R.M., Zheng J., Stiles, M.E., Carlsson, D., Franz, C.M.A.P., McMullen, L. and van Belkum, M.J. (2011). Identification of an N-terminal formylated, two-peptide bacteriocin from *Enterococcus faecalis* 710C. *J. Agric. Food Chem.* 59:5602-5608.
- Lohans, C.T., Towle, K.M., Miskolzie, M., McKay, R.T., van Belkum, M.J., McMullen, L.M. and Vederas, J.C. (2013). Solution structures of the linear leaderless bacteriocins enterocin 7A and 7B resemble carnocyclin A, a circular antimicrobial peptide. *Biochemistry* 52:3987-3994.
- Martín, M., Gutiérrez, J., Criado, R., Herranz, C., Cintas, L.M. and Hernández, P.E. (2006). Genes encoding bacteriocins and their expression, and potential virulence factors of enterococci isolated from wood pigeons (*Columba palumbus*). *J. Food Prot.* 69:520-531.
- Martín-Platero, A.M., Valdivia, E., Ruiz-Rodríguez, M., Soler, J.J., Martín-Vivaldi, M., Maqueda, M. and Martínez-Bueno, M. (2006). Characterization of antimicrobial substances produced by *Enterococcus faecalis* MRR 10-3, isolated from the uropygial gland of the Hoopoe (*Upupa epops*). *Appl. Environ. Microbiol.* 72:4245-4249.
- Masuda, Y., Zendo, T., Sawa, N., Perez, R.H., Nakayama, J. and Sonomoto, K. (2012). Characterization and identification of weissellicin Y and weissellicin M, novel bacteriocins produced by *Weissella hellenica* QU 13. *J. Appl. Microbiol.* 112:99-108.
- Moreno, M.R., Leistner, J.J., Tee, L.K., Ley, C., Rusul, G., Vancanneyt, M. and De Vuyst, L. (2002). Microbial analysis of Malaysian tempeh, and characterization of two bacteriocins produced by isolates of *Enterococcus faecium*. *J. Appl. Microbiol.* 92:147-157.
- Natale, P., Brügger, T. and Driessen, A.J.M. (2008). Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane: distinct translocases and mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta.* 1778:1735-1756.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Håvarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V. and Holo, H. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70:113-128.
- Nes, I.F., Diep, D.B. and Holo, H. (2007). Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol.* 189:1189-1198.

- Nes, I.F., Diep, D.B. and Ike, Y. (2014). Enterococcal bacteriocins and antimicrobial proteins that contribute to niche control. In: *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Editor: Gilmore, M.S., Associate editors: Clewell, D.B., Ike, Y., Shankar, N., editors. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary.
- Netz, D.J.A., Sahl, H.G., Marcolino, J., Dos Santos Nascimento, S., Soares de Oliveira, M., Bento Soares, M. and Bastos, M.C.F. (2001). Molecular characterisation of aureocin A70, a multiple bacteriocin isolated from *Staphylococcus aureus*. *J. Mol. Biol.* 311:939-949.
- Netz, D.J.A., Pohl, R., Beck-Sickinger, A.G., Selmer, T., Pierik, A.J., Bastos, M.C.F. and Sahl, H.G. (2002). Biochemical characterisation and genetic analysis of aureocin A53, a new, atypical bacteriocin from *Staphylococcus aureus*. *J. Mol. Biol.* 319:745-756.
- Nijland, R., Heerlien, R., Hamoen, L.W. and Kuipers, O.P. (2007). Changing a single amino acid in *Clostridium perfringens* alfa-toxin affects the efficiency of heterologous secretion in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:1586-1593.
- Ruíz-Barba, J.L., Floriano, B., Maldonado-Barragán, A. and Jiménez-Díaz, R. (2007). Molecular analysis of the 21-kb bacteriocin-encoding plasmid pEF1 from *Enterococcus faecium* 6T1a. *Plasmid* 57:175-181.
- Ruíz-Rodríguez, M., Martínez-Bueno, M., Martín-Vivaldi, M., Valdivia E. and Soler, J.J. (2013). Bacteriocins with a broader antimicrobial spectrum prevail in enterococcal symbionts isolated from the hoopoe's uropygial gland. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85:495-502.
- Sánchez, J., Basanta, A., Gómez-Sala, B., Herranz, C., Cintas, L.M. and Hernández, P.E. (2007). Antimicrobial and safety aspects, and biotechnological potential of bacteriocinogenic enterococci isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Int. J. Food Microbiol.* 117:295-305.
- Sánchez, J., Borrero, J., Gómez-Sala, B., Basanta, A., Herranz, C., Cintas, L.M. and Hernández, P.E. (2008). Cloning and heterologous production of hiracin JM79, a Sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, in lactic acid bacteria and *Pichia pastoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:2471-2479.
- Sánchez-Hidalgo, M., Maqueda, M., Gálvez, A., Abriouel, H., Valdivia, E. and Martínez-Bueno, M. (2003). The genes coding for enterocin EJ97 production by *Enterococcus faecalis* EJ87 are located on a conjugative plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1633-1641.
- Sandiford, S. and Upton, M. (2012). Identification, characterization, and recombinant expression of epidermicin NI01, a novel unmodified bacteriocin produced by *Staphylococcus epidermidis* that displays potent activity against staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:1539–1547.
- Santos J., Varella, M.L., Ceotto, H., Potter, A., Rocha, L., Salehian, Z., Nes, I.F. and Freire, M.C. (2012). Genes involved in immunity to an secretion of aureocin A53, an atypical class II bacteriocin produced by *Staphylococcus aureus* A53. *J. Bacteriol.* 194:875-883.
- Strompfová, V., Lauková, A., Simonová, M. and Marciňáková, M. (2008). Occurrence of the structural enterocin A, P, B, L50B genes in enterococci of different origin. *Vet. Microbiol.* 132:293-301.

- Swe, P.M., Heng, N.C.K., Ting, Y-T., Baird, H.J., Carne, A., Tauch, A., Tagg, J.R. and Jack, R.W. (2007). *efl097* and *ypkK* encode enterococcin V583 and corynicin JK, members of a new family of antimicrobial proteins (bacteriocins) with modular structure from Gram-positive bacteria. *Microbiology* 153:3218-3227.
- Thornton, R.F., Kagawa, T.F., O'Toole, P.W. and Cooney, J.C. (2010). The dissemination of C10 cysteine protease genes in *Bacterioides fragilis* by mobile genetic elements. *BMC Microbiol.* 10:122.
- Willems, R.J.L., Hanage, W.P., Bessen, D.E. and Feil, E.J. (2011). Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 35:872-900.
- Wu, Z., Wang, W., Tang, M., Shao, J., Dai, C., Zhang, W., Fan, H., Yao, H., Zong, J., Chen, D., Wang, J. and Lu, C. (2014). Comparative genomic analysis shows that *Streptococcus suis meningitis* isolate SC070731 contains a unique 105K genomic island. *Gene* 535:156-164.



# CAPÍTULO 7

## Discusión general



**Nota aclaratoria:** a lo largo de este capítulo se muestran los resultados descritos en los capítulos 3, 4, 5 y 6 y las conclusiones derivadas de éstos. Para ello, se hará referencia a Figuras y Tablas de los capítulos citados, las cuales se reseñarán con el número del capítulo de dónde proceden y su número de identificación en el capítulo correspondiente.

## **7.1. CLONACIÓN, PRODUCCIÓN Y EXPRESIÓN FUNCIONAL DE LA BACTERIOCINA SAKACINA A (SakA) Y DE DOS QUIMERAS DE LA SakA, POR BACTERIAS LÁCTICAS (BAL) Y LAS LEVADURAS *Pichia pastoris* Y *Kluyveromyces lactis***

### **RESUMEN**

Las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas (BAL) deberían evaluarse por su posible utilización como péptidos antimicrobianos naturales en la industria alimentaria, en medicina humana y veterinaria y en producción animal, mientras las BAL productoras de bacteriocinas deberían hacerlo por su utilidad como probióticos. Sin embargo, los bajos rendimientos en la producción y recuperación de bacteriocinas tras su purificación de los sobrenadantes libres de células de los productores naturales y el elevado coste de la síntesis de péptidos sintéticos, cataliza y dirige la exploración de sistemas de producción heteróloga de bacteriocinas por microorganismos que las produzcan en mayores cantidades o con una mayor actividad antimicrobiana. La sakacina A (SakA) es una bacteriocina de la clase IIa con actividad antilisteriana y producida por *Lb. sakei* Lb706. Sin embargo, la síntesis de SakA es un proceso regulado por la temperatura a través de un péptido feromona y un sistema regulador de tres componentes constituido por el factor de inducción (SapPh), la proteína histidina quinasa (SapK) y la proteína reguladora de respuesta (SapR).

Por ello, para evaluar la producción de esta bacteriocina, tan fuertemente regulada, por otros hospedadores microbianos se ha procedido a la fusión de la sakacina A madura (SakA, codificada por *sapA*) y de su proteína conocida de inmunidad (SakI, codificada por *sapiA*), así como de dos de las quimeras génicas de la SakA con la secuencia N-terminal de la enterocina A madura (EntA/SakA) y de la enterocina P madura (EntP/SakA), a diversos péptidos señal (PS) así como a su clonación en vectores de expresión proteica con promotores constitutivos (pMG36c) o inducibles (pNZ8048), para evaluar su producción y expresión funcional por *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 y *Lb. sakei* Lb706. Más aún, la clonación de los genes que codifican la SakA madura y la quimera EntP/SakA en diversos vectores de expresión proteica han permitido, también, la evaluación de su producción y expresión funcional por las levaduras *P. pastoris* X-33 y *K. lactis* GG799.

De los resultados obtenidos se deduce que la producción, actividad antimicrobiana y actividad antimicrobiana específica de la SakA y de sus quimeras producidas por *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 dependió del péptido señal (PS) y del vector de expresión utilizados. Solamente *L. lactis* NZ9000 (pNUPS), productor de EntP/SakA mostró en sus sobrenadantes una mayor producción de bacteriocina y actividad antimicrobiana que *Lb. sakei* Lb706, productor natural de SakA. La menor actividad antimicrobiana producida por *L.*



*lactis* NZ9000 (pNUS), productor de SakA y por *L. lactis* NZ9000 (pNUAS), productor de EntA/SakA, se debió a la secreción de bacteriocinas truncadas. Por otra parte, de los cultivos de *Lb. sakei* Lb706 transformados con los vectores derivados de pMG36c solamente *Lb. sakei* Lb706 (pGUS), sobreproductor de SakA, mostró una mayor actividad antimicrobiana que el productor natural *Lb. sakei* Lb706. Finalmente, la clonación de la SakA y EntP/SakA en los vectores de expresión pPICZ $\alpha$ A y pKLAC2, respectivamente, permitió la producción de SakA y EntP/SakA por cepas recombinantes derivadas de *P. pastoris* X-33 y *K. lactis* GG799 aunque su actividad antimicrobiana fué mucho menor de la deducida de su producción en los sobrenadantes de las levaduras productoras.

### **7.1.1. Construcción de vectores de expresión derivados de los plásmidos pNZ8048 y pMG36c**

La construcción de quimeras génicas derivadas de la fusión de los péptidos señal (PS) de la proteína Usp45 (PS<sub>usp45</sub>), de la bacteriocina EntP (PS<sub>entP</sub>) y de la bacteriocina HirJM79 (PS<sub>hirJM79</sub>) a la SakA madura (*sapA*) con su gen de inmunidad (*saiA*) y su posterior clonación en el vector de expresión proteica con promotor inducible pNZ8048 originó los plásmidos derivados pNUS, pNPS y pNHS, respectivamente. Asimismo, la construcción de fusiones génicas derivadas de la fusión del PS<sub>usp45</sub> a las quimeras génicas derivadas de la SakA, EntP/SakA (*GCTACG::sapA*) y EntA/SakA (*ACCACTCATAGTGGTAAATAT::sapA*) y su posterior clonación en el mismo vector de expresión originaron los plásmidos derivados pNUPS y pNUAS, respectivamente. Cuando las construcciones génicas derivadas de la fusión del PS<sub>usp45</sub> a la SakA madura (*sapA*) con su gen de inmunidad (*saiA*) y a la EntP/SakA y EntA/SakA se clonaron en el vector de expresión proteica con promotor constitutivo pMG36c, los plásmidos derivados resultantes fueron los denominados pGUS, pGUPS y pGUAS, respectivamente (Tabla 3.1).

### **7.1.2. Construcción de vectores de expresión derivados de los plásmidos pPICZ $\alpha$ A y pKLAC2**

La clonación de construcciones génicas derivadas de la fusión del factor Kex2 a la SakA madura (*sapA*) y a la quimera génica EntP/SakA (*GCTACG::sapA*) en los vectores de expresión proteica con promotores inducibles pPICZ $\alpha$ A y pKLAC2, originaron los plásmidos derivados resultantes denominados pPSA, pPPSA, pKSA y pKPSA, respectivamente (Tabla 3.1).

### **7.1.3. Producción heteróloga y expresión funcional de la SakA y de dos de sus quimeras génicas por bacterias lácticas (BAL) y las levaduras *Pichia pastoris* y *Kluyveromyces lactis*.**

La transformación de los plásmidos recombinantes, citados previamente, en las BAL hospedadoras *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 y *Lb. sakei* Lb706 y en las levaduras *P. pastoris* X-33 y *K. lactis* GG799, facilitaron la obtención de BAL y levaduras recombinantes productoras de bacteriocinas. Igualmente, a diferencia de la mayoría de estudios en los que la

producción heteróloga de proteínas y péptidos se determina cualitativamente mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) o mediante ensayos de identificación y cuantificación de proteínas y péptidos por “Western-blot”, la obtención y utilización de anticuerpos policlonales específicos anti-región C-terminal de la SakA y el desarrollo y puesta a punto de un ensayo inmunoenzimático no competitivo indirecto (ELISA-NCI) permitieron, en este trabajo, la identificación y cuantificación de la producción tanto de la SakA como de sus dos quimeras génicas, en los sobrenadantes de las BAL y las levaduras productoras.

De los resultados obtenidos en este trabajo se observa que, aparentemente, tanto la producción como la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas producidas por las BAL recombinantes dependen del PS, del vector de expresión y de la cepa hospedadora. La producción y secreción de SakA por las cepas recombinantes de *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 ocurrió cuando la bacteriocina madura se encontraba fusionada al PS<sub>Usp45</sub> y PS<sub>HirJM79</sub> mientras el PS<sub>EntP</sub> se mostró incapaz de liderar o dirigir el procesamiento, transporte y secreción de la SakA madura al medio extracelular (**Tabla 3.3**). Esta última observación es muy interesante ya que el PS<sub>EntP</sub> ha permitido con éxito el procesamiento, transporte y secreción de la PedA-1 (Martín y col., 2007a) y de la EntA (Martín y col., 2007b; Borrero y col., 2011b) por cepas recombinantes de *L. lactis*. No obstante, es posible que la región N-terminal de la SakA influya en el plegamiento y secreción de la bacteriocina, imposibilitando su translocación a través de la membrana citoplasmática del productor por influencia de su carga neta. De los resultados obtenidos, también se deduce que el PS más adecuado para el procesamiento, transporte y secreción de la SakA y de sus dos quimeras génicas por las BAL evaluadas es el PS<sub>Usp45</sub> (**Tabla 3.3**).

Los resultados de este trabajo también sugieren que la producción de SakA y de sus dos quimeras génicas se encuentra fuertemente asociada al vector de expresión proteica utilizado y, sorprendentemente, difieren de observaciones anteriores donde la producción de bacteriocinas era siempre mayor cuando la expresión génica procedía de la utilización de vectores de expresión con promotores inducibles en vez de constitutivos (Gutiérrez y col., 2006; Kim y Mills, 2007; Martín y col., 2007a,b; Sánchez y col., 2008; Borrero y col., 2011a,b). No obstante, conviene conocer que otros factores como la estabilidad del ARNm y su estructura secundaria pueden afectar la producción de la bacteriocina SakA y de sus dos quimeras génicas derivadas por las cepas recombinantes de *L. lactis* (Diep y col., 2009).

Los sobrenadantes de la mayoría de las cepas de *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 transformadas con derivados del plásmido pNZ8048, muestran una actividad antimicrobiana menor de la deducida derivada de la cuantificación de su producción de SakA, EntP/SakA y EntA/SakA excepto para la cepa de *L. lactis* NZ9000 (pNUPS), con una actividad antimicrobiana en el rango de la esperada de su producción de EntP/SakA. Es posible, que el desplazamiento de la carga positiva en la posición +2 de la región N-terminal de la SakA a la posición +3 en la quimera EntP/SakA, haya posibilitado un mejor reconocimiento del lugar de corte de la peptidasa encargada del procesamiento de la EntP/SakA. Por otra parte, las cepas recombinantes derivadas de transformar *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 con

plásmidos derivados del pMG36c, muestran una actividad antimicrobiana menor de la esperada. Se sabe que no siempre una elevada producción de bacteriocina se traduce en una mayor actividad antimicrobiana. Es posible que diversos factores como los derivados de la regulación al estrés debido a plegamientos erróneos de las bacteriocinas en el interior celular (Damon y col., 2002), diferencias en la maquinaria y proteínas translocadoras de la ruta general de transporte (GSP) o Sec-dependiente por diferencias en el PS y la célula productora, y conformaciones proteicas erróneas y modificaciones postraduccionales en las bacteriocinas que originen la secreción de bacteriocinas biológicamente menos activas (Sarvas y col., 2004), puedan afectar y modificar la actividad antimicrobiana final de las bacteriocinas y de sus quimeras en los sobrenadantes de las células productoras.

Asímismo, la transformación de *Lb. sakei* Lb706 con los plásmidos derivados del vector de expresión pMG36c permitió una producción ligeramente mayor de SakA, EntP/SakA y EntA/SakA que la producción de SakA por el productor natural *Lb. sakei* Lb706 (**Tabla 3.3**). Igualmente, los sobrenadantes de *Lb. sakei* Lb706 (pGUS) mostraron una mayor actividad antimicrobiana (2,3-2,9 veces mayor) que los de *Lb. sakei* Lb706 (pGUPS), *Lb. sakei* Lb706 (pGUAS) y *Lb. sakei* Lb706, posiblemente, debido a la agregación de las bacteriocinas entre sí o con componentes del medio de cultivo, a la menor afinidad por receptores o a otras razones todavía difíciles de evaluar.

Finalmente, conviene hacer notar que aunque la mayoría de los productores recombinantes derivados de *L. lactis* NZ9000 y *Lb. sakei* Lb706 produjeron una mayor cantidad de SakA, EntP/SakA y EntA/SakA que el productor natural *Lb. sakei* Lb706, solamente *L. lactis* NZ9000 (pNUPS) y *Lb. sakei* Lb706 (pGUS) mostraron una mayor actividad antimicrobiana (1,9 a 6,4 veces mayor y 2,3 a 2,9 veces mayor) y una actividad antimicrobiana específica (1,3 a 4,5 veces mayor y 1,0 a 1,3 veces mayor), respectivamente, que la SakA producida por *Lb. sakei* Lb706 (**Tabla 3.3**).

La producción heteróloga y expresión funcional de la SakA y EntP/SakA por levaduras recombinantes, también se determinó mediante un método de ELISA-NCI y un ensayo en placas microtituladoras (MPA), respectivamente (**Tabla 5.3**). El desarrollo y producción de SakA por *P. pastoris* X-33SA fueron menores que el desarrollo y producción de EntP/SakA por *P. pastoris* X-33PSA, aunque la producción de SakA y EntP/SakA por las levaduras recombinantes fué de 1,8 y 24,2 veces mayor, respectivamente, que la producción de SakA por *Lb. sakei* Lb706. Sin embargo, ni la SakA ni la EntP/SakA, producidas por *P. pastoris* X-33, mostraron actividad antimicrobiana en sus sobrenadantes (**Tabla 5.3**). Por otra parte, el el desarrollo de *K. lactis* GG799SA y *K. lactis* GG799PSA fueron similares mientras que la producción de SakA fue de 11,4 veces mayor y la de EntP/SakA de 55,2 veces mayor, respectivamente, que la producción de SakA por *Lb. sakei* Lb706. Sin embargo, la actividad antimicrobiana total y específica de la SakA y EntP/SakA producidas por las levaduras productoras derivadas de *K. lactis* GG799 fueron mucho menores que las deducidas de su producción en los sobrenadantes libres de células (**Tabla 5.3**).

La producción y actividad antimicrobiana de las bacteriocinas SakA y EntP/SakA, producidas por levaduras recombinantes derivadas de *P. pastoris* X-33 y *K. lactis* GG799, aunque decepcionantes no resultan inesperados ya que bacteriocinas clonadas en otras levaduras como *S. cerevisiae* (Schoeman y col., 1999; van Reenen y col., 2002; Basanta y col., 2009), *P. pastoris* (Beaulieu y col., 2005; Gutiérrez y col., 2005; Sánchez y col., 2008; Basanta y col., 2010; Borrero y col., 2012) y *K. lactis* (Borrero y col., 2012), se han secretado y expresado con resultados muy diferentes. Es posible que, al igual que ocurre con la producción de las bacteriocinas SakA y EntP/SakA por BAL el desplazamiento de cargas cercanas al lugar de hidrólisis por la peptidasa, favorezca la secreción de la EntP/SakA por *P. pastoris* X-33PSA y *K. lactis* GG799PSA. Sin embargo, también se ha observado que el crecimiento de *P. pastoris* X-33SA parece afectado por la producción de SakA (**Tabla 5.3**). Uno de los cuellos de botella que la producción heteróloga de péptidos y proteínas en levaduras debe sortear es el correcto plegamiento del péptido o proteína sintetizado. Un péptido o proteína mal plegados puede acumularse en el retículo endoplásmico (RE) de la levadura, activando una respuesta para intentar plegar la proteína correctamente y, otra, para degradarla lo que origina la acumulación de especies reactivas del oxígeno (ERO) con un permanente estado de estrés del retículo endoplásmico (RE), que finaliza con una apoptosis celular (Gasser y col., 2008; Hwang y col., 2012).

#### 7.1.4. Purificación de la SakA y de dos de sus quimeras y determinación de su tamaño molecular por espectrometría de masas

La SakA producida por *Lb. sakei* Lb706 y *L. lactis* NZ9000 (pNUS), la EntP/SakA producida por *L. lactis* NZ9000 (pNUPS) y la EntP/SakA producida por *L. lactis* NZ9000 (pNUAS), se purificaron a homogeneidad mediante un procedimiento cromatográfico previamente evaluado. La determinación de la masa molecular de las bacteriocinas purificadas por espectrometría de masas (MALDI-TOF MS), demostró que la masa molecular de la SakA producida por *L. lactis* NZ9000 (pNUS) era menor (3.805,3 Da) que la de la SakA (4.306,9 Da) producida por *Lb. sakei* Lb706. Asimismo, la EntP/SakA purificada mostró un fragmento mayoritario de 4.410,5 Da y la EntA/SakA un fragmento mayoritario de 3.805,8 Da (**Figura 3.1**). Dado que las masas moleculares de la SakA y de la EntA/SakA, producidas por *L. lactis* NZ9000, son casi idénticas entre sí pero menores que su masa molecular teórica de 4.308,8 y 4.769,3 Da, respectivamente, parece que ambas bacteriocinas se hubieran procesado y secretado de manera anormal. Por ello, para resolver esta incongruencia se procedió a la determinación de la secuencia aminoacídica N-terminal de ambas bacteriocinas mediante la técnica de degradación de Edman. Los resultados obtenidos mostraron que ambas bacteriocinas poseían la secuencia aminoacídica N-terminal NGVY-, lo que significa que, ambas bacteriocinas SakA y EntA/SakA, han perdido sus primeros cinco (ARSYG-) y nueve (TTHSGKYYG-) aminoácidos terminales, respectivamente, durante su procesado y secreción al exterior de las células recombinantes de *L. lactis* NZ9000. Conviene hacer notar que este es el primer estudio que describe la producción de bacteriocinas truncadas por BAL recombinantes. Sin embargo, las bacteriocinas truncadas SakA y EntA/SakA, producidas por *L. lactis* NZ9000, todavía mantienen una reducida pero cuantificable actividad antimicrobiana, quizás debido a la interacción inespecífica de su

secuencia N-terminal a los receptores de sus células sensibles mediante interacciones electrostáticas (Chen y col., 1977).

Cabe destacar, igualmente, que todas las bacteriocinas purificadas mostraron fragmentos peptídicos de un tamaño molecular acorde con la presencia de ninguna, una (+16 Da) o dos (+32 Da) metioninas oxidadas (MetSO) en la secuencia de la SakA (Met<sup>30,41</sup>). No obstante, la oxidación de los residuos de metionina durante la producción heteróloga de bacteriocinas o durante su purificación a homogeneidad es una observación muy común (Johnsen y col., 2000); Martín y col., 2007b; Borrero y col., 2011b).

Aunque, como se ha descrito previamente, en los sobrenadantes de las levaduras recombinantes no se observó una actividad antimicrobiana relevante, no obstante, se procedió a la purificación a homogeneidad de su posible actividad antimicrobiana siguiendo un procedimiento previamente descrito para la purificación de bacteriocinas de los sobrenadantes de las BAL. De los resultados obtenidos, cabe destacar que se observó una elevada actividad antimicrobiana en las fracciones eluidas tras la cromatografía de filtración en geles, excepto en los sobrenadantes de *P. pastoris* X-33SA. Sin embargo, la determinación por MALDI-TOF MS de las masas moleculares de las bacteriocinas purificadas demostraron que la EntP/SakA, producida por *P. pastoris* X-33PSA, mostró un fragmento minoritario de 4.439,9 Da y fragmentos mayoritarios de mayor masa molecular (5.400 a 5.800 Da) (**Figura 3.2**). Igualmente, la SakA purificada producida por *K. lactis* GG799SA mostró un fragmento mayoritario de 4.351,6 Da y otros fragmentos peptídicos de mayor masa molecular (> 4.400 Da), mientras que la EntP/SakA, producida por *K. lactis* GG799PSA, también mostró un fragmento peptídico minoritario de 4.285,3 Da y numerosos fragmentos de mayor masa molecular (5.500 a 6.100 Da) (**Figura 3.2**).

Es posible que los fragmentos peptídicos de mayor tamaño se deban a la agregación de las bacteriocinas a otros componentes del medio de crecimiento aunque, lo más plausible, es que ambas bacteriocinas se hayan sometido a modificaciones postraduccionales (MPT). Las MPT más comunes de péptidos y proteínas son las de fosforilación, acetilación, metilación, oxidación, formilación, formación de enlaces disulfuro y N- y O-glicosilación (Mann y Jensen, 2003; Zhao y Jensen, 2009). La presencia de residuos de cisteína y metionina en la SakA y EntP/SakA puede conducir a la formación de enlaces disulfuro pero también a su oxidación, glutationilización y cisteinilización. La reacción de glicosilación es también común en eucariotas con formación de enlaces a través de la secuencia Asn-X-Ser/Thr (N-glicosilación) o a través de los residuos de serina (Ser) y treonina (Thr) (O- glicosilación). La ausencia en la SakA y EntP/SakA de lugares de unión para N-glicosilaciones precluye su existencia pero la existencia de tres serinas y dos treoninas en su molécula, permite la existencia de O-glicosilaciones.

### 7.1.5. Actividad antimicrobiana frente a *Listeria* spp. de los sobrenadantes de las BAL productoras de bacteriocinas

De los sobrenadantes de todas las cepas evaluadas, los de *L. lactis* NZ9000 (pNUPS) y *Lb. sakei* Lb706 (pGUS), productores de EntP/SakA y SakA, respectivamente, mostraron la mayor actividad antilisteriana que llegó a ser de hasta 5,4 veces mayor que la mostrada por otras cepas recombinantes (**Tabla 3.4**). En este contexto, las cepas recombinantes de *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 con mayor producción de SakA o de sus quimeras, no sometidas regulación por la temperatura y otros sistemas de regulación génica, así como las cepas recombinantes de *Lb. sakei* Lb706 más productoras de SakA y con una mayor actividad antimicrobiana en sus sobrenadantes, podrían evaluarse como cultivos iniciadores o protectores o como factorías celulares para la producción y liberación de bacteriocinas de interés en la industria alimentaria, medicina humana y veterinaria, y producción animal. No obstante, debería realizarse un mayor esfuerzo investigador para identificar aquellos factores críticos o determinantes para la producción y expresión funcional de diversas bacteriocinas y sus quimeras por BAL y levaduras recombinantes.

## 7.2. USO DE GENES SINTÉTICOS PARA LA CLONACIÓN, PRODUCCIÓN Y EXPRESIÓN FUNCIONAL DE LAS BACTERIOCINAS ENTEROCINA A Y BACTERIOCINA E 50-52 POR *Pichia pastoris* Y *Kluyveromyces lactis*

### RESUMEN

El diseño y utilización de genes sintéticos puede constituir una aproximación razonable para la producción heteróloga y expresión funcional de bacteriocinas u otros péptidos antimicrobianos por levaduras recombinantes. Por ello, en este trabajo se procedió al diseño y síntesis química de genes con el codon de uso adaptado a la producción de proteínas y péptidos por las levaduras *P. pastoris* y *K. lactis* y deducidos de la secuencia aminoacídica conocida de la bacteriocina enterocina A (EntA), producida por *E. faecium* T136 y la bacteriocina E50-52 (BacE50-52), producida por *E. faecium* NRRL B-30746. Una vez sintetizados, los genes *entA* y *bacE50-52* se clonaron en los vectores de expresión proteica pPICZαA y pKLAC2 para la transformación de los vectores resultantes derivados en *P. pastoris* X-33 y *K. lactis* G799, respectivamente. Los vectores recombinantes, linearizados y transformados en las células competentes apropiadas permitieron la selección de *P. pastoris* X-33EAS (*entA*), *P. pastoris* X-33BE50-52S (*bacE50-52*), *K. lactis* GG799EAS (*entA*) y *K. lactis* GG799BE50-52S (*bacE50-52*). Las cepas de *P. pastoris* X-33EAS y *K. lactis* GG799EAS pero no los de *P. pastoris* X-33BE50-52S y *K. lactis* GG799BE50-52S, mostraron actividad antimicrobiana en sus sobrenadantes. La cepa de *P. pastoris* X-33EA permitió incrementar significativamente la producción, actividad antimicrobiana y actividad antimicrobiana específica de la EntA en ausencia de proteínas dedicadas de secreción y de inmunidad. No obstante, este resultado contrasta con la menor producción y actividad antimicrobiana de la EntA producida por *K. lactis* GG799EAS y con la escasa actividad antimicrobiana de la BacE50-52 producida por *P. pastoris* X-33BE50-52S y *K. lactis* GG799BE50-52S. La purificación de los sobrenadantes libres de células de las levaduras

recombinantes productoras permitió la recuperación y purificación de las bacteriocinas EntA y BacE50-52. Todas las bacteriocinas purificadas mostraron actividad antimicrobiana frente a las bacterias Gram-positivas evaluadas incluyendo *L. monocytogenes* pero no frente a diversas bacterias Gram-negativas, incluyendo *Campylobacter jejuni*.

### **7.2.1. Construcción de vectores de expresión derivados de los plásmidos pPICZ $\alpha$ A y pKLAC2**

La construcción de quimeras génicas del factor alfa-Kex2 fusionado al gen sintético de la enterocina A (EntA) madura y al gen sintético de la bacteriocina E 50-52 (BacE50-52) madura, ambas con el codón de uso adaptado para su procesamiento, transporte y secreción por *P. pastoris* y *K. lactis*, así como su posterior clonación en los vectores de expresión proteica inducibles pPICZ $\alpha$ A y pKLAC2 permitieron la obtención de los plásmidos derivados recombinantes pPICEAS, pPICBE50-52S, pKLEAS y pKLBE50-52S, respectivamente (**Tabla 4.1**).

### **7.2.2. Producción heteróloga y expresión funcional de la EntA y BacE50-52 por las levaduras *Pichia pastoris* y *Kluyveromyces lactis***

Cuando los plásmidos derivados recombinantes pPICEAS, pPICBE50-52, pKLEAS y pKLBE50-52S se emplearon para transformar *P. pastoris* X-33 (con pPICEAS y pPICBE50-52) y *K. lactis* GG799 (con pKLEAS y pKLBE50-52S), solamente las levaduras recombinantes productoras de EntA mostraron actividad antimicrobiana directa por picadura o en sus sobrenadantes libres de células, mientras que las levaduras productoras de la BacE50-52 no lo hicieron (**Tabla 4.3 y Tabla 4.4**). En este sentido, conviene conocer que un número variable de factores como el número de copias de los vectores de expresión integrados en el genoma de las levaduras, la estabilidad del mRNA sintetizado, los promotores que dirigen la síntesis de péptidos y proteínas, la estructura secundaria del péptido o proteína sintetizada, la adecuada coordinación entre la síntesis proteica y el plegamiento del péptido o la proteína producidos, el correcto procesamiento y secreción de la bacteriocina producida y la coordinación de la velocidad de síntesis, el plegamiento y la translocación de las bacteriocinas puede, indudablemente, afectar la producción de bacteriocinas por las levaduras recombinantes productoras (Diep y col., 2009; Idiris y col., 2011; Borrero y col., 2011b).

También se conoce que la secuencia aminoacídica próxima a la señal de secreción y las características del lugar de corte para el procesamiento y secreción de los péptidos y proteínas por los sistemas de secreción Sec-dependientes, intervienen activamente en la secreción de péptidos y proteínas fusionados a diversos péptidos señal (PS) en bacterias y levaduras (Le Loir y col., 1998). Por ello, ya que la EntA posee la secuencia aminoacídica TTHSGKY antes de la secuencia consenso YGNGVx de las bacteriocinas de la clase IIa y la BacE50-52 posee la secuencia TTKN antes de su secuencia consenso YGNGVC, es posible que el residuo aminoacídico K<sup>+</sup> de la BacE50-52 limite su procesamiento y secreción por las levaduras recombinantes. Se sabe que bacteriocinas clonadas en *S. cerevisiae* (Schoeman y

col., 1999; van Reenan y col., 2002; Basanta y col., 2009), *P. pastoris* (Beaulieu y col., 2005; Gutiérrez y col., 2005, Gutiérrez y col., 2005; Basanta y col., 2010; Borrero y col., 2012; Jiménez y col., 2013), *K. lactis*, *H. polymorpha* y *A. adenivorans* (Borrero y col., 2012; Jiménez y col., 2013) se producen por las levaduras recombinantes con un éxito variable respecto a su producción y expresión funcional.

La producción y expresión funcional de la EntA por *P. pastoris* X-33EAS y *K. lactis* GG799EAS se cuantificaron mediante anticuerpos policlonales específicos anti-EntA y un ELISA indirecto no competitivo (ELISA-NCI) (Borrero y col., 2011b), así como mediante un ensayo de actividad antimicrobiana en placas microtituladoras (MPA). Los resultados obtenidos mostraron que la producción de EntA por *P. pastoris* X33EAS fue 21,4 veces mayor, su actividad antimicrobiana 235 veces mayor y su actividad antimicrobiana específica 11 veces mayor que la EntA producida por *E. faecium* T136. Sin embargo, la producción de EntA por *K. lactis* GG799EAS fue 1,2 veces mayor aunque su actividad antimicrobiana y actividad antimicrobiana específicas fueron 2,5 veces y 6,1 veces menores, respectivamente, que la EntA producida por *E. faecium* T136 (**Tabla 4.3**).

La diferente producción de EntA por *P. pastoris* X-33EAS y *K. lactis* GG799EAS podría deberse a diferencias en sus promotores, al número de copias de *entA* insertado en su genoma o a las diferencias genéticas entre ambas especies de levaduras. Asimismo, la pérdida de actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de las levaduras productoras durante su desarrollo podría deberse a la adsorción de la EntA a su pared celular, a la formación de agregados o a la degradación proteolítica de la bacteriocina por proteasas, endocelulares o extracelulares, no determinadas (Borrero y col., 2012). No obstante, la producción, actividad antimicrobiana y actividad antimicrobiana específica de la EntA producida por *P. pastoris* X-33EAS fueron ligeramente menores que la producción y actividad antimicrobiana de la EntA producida por *P. pastoris* X-33EA (Borrero y col., 2012). Sin embargo, la producción recombinante de EntA por numerosas BAL ha demostrado que aunque su producción es siempre mayor que la EntA producida por *E. faecium* T136 su actividad antimicrobiana y su actividad antimicrobiana específica siempre han sido menores que las deducidas de su producción en los sobrenadantes de los medios de cultivo (Martín y col., 2007; Borrero y col., 2011a).

### **7.2.3. Purificación a homogeneidad de la EntA y BacE50-52 y determinación de su tamaño molecular por espectrometría de masas**

La EntA, producida por *P. pastoris* X-33EAS y *K. lactis* GG799EAS, se purificó a homogeneidad siguiendo un protocolo de purificación previamente establecido mientras la purificación de la BacE50-52, producida por *P. pastoris* X-33BE50-52S y *K. lactis* GG799BE50-52S, demostró que solamente las fracciones eluidas tras su filtración por columnas de filtración en gel mostraron una actividad antimicrobiana definida (**Tabla 4.4**).

La determinación por MALDI-TOF MS del tamaño molecular de la EntA producida por *P. pastoris* X-33EAS, mostró la existencia de un fragmento peptídico mayoritario con una



masa molecular idéntica (4.844,4 Da) a la de la EntA producida por *E. faecium* T136 (**Figura 4.1.A**). Es también posible que la fracción de 4.860,2 Da se deba a una oxidación de la metionina (Met<sup>33</sup>), situación común durante la producción heteróloga de EntA por diversas BAL (Martín y col., 2007a; Borrero y col., 2011b). Sin embargo, la purificación de la EntA producida por *K. lactis* GG799EAS no solamente originó un fragmento peptídico mayoritario de 4.844,3 Da, sino otros fragmento de masas moleculares mayores y menores de la citada (**Figura 4.1.B**). Es por ello posible que la *entA* sintética, clonada en *K. lactis* GG799EAS, produzca una EntA deficientemente plegada que dificulte su procesamiento, secreción y expresión funcional (Gasser y col., 2008). La menor producción de EntA por *K. lactis* GG799EAS y la presencia de fragmentos purificados de menor tamaño molecular también sugieren la existencia de formas truncadas de la bacteriocina, su interacción con otros compuestos todavía desconocidos o la existencia de modificaciones postraduccionales (PTM), como las descritas en el apartado 7.1 de esta memoria (Beaulieu y col., 2005; Zhao y Jensen, 2009; Jiménez y col., 2013). La ausencia en la EntA de lugares de unión para N-glicosilaciones precluye su existencia pero la presencia de seis treoninas y dos serinas en su molécula permite la existencia de O-glicosilaciones.

Asimismo, el análisis por MALDI-TOF MS de la BacE50-52 producida por *P. pastoris* X-33BE50-52S demostró la presencia de un fragmento peptídico mayoritario de 4.117,6 Da, idéntico a la masa molecular teórica de la BacE50-52 (4.125,7 Da) asumiendo la formación de tres enlaces disulfuro entre las seis cisteínas de su secuencia aminoacídica. No obstante, la purificación de dicha bacteriocina también originó la presencia de otros fragmentos peptídicos de mayor masa molecular (**Figura 4.2.A**). Por otro lado, la BacE50-52 purificada, producida por *K. lactis* GG799BE50-52S, mostró la existencia de un fragmento peptídico mayoritario de una masa molecular mayor (4.851,8 Da) que la deducida de su masa molecular teórica (4.125,7 Da) (**Figura 4.2.A**). La presencia de seis residuos de cisteína en la BacE50-52 puede permitir la formación de enlaces disulfuro pero también facilitar su oxidación, glutationilización y cisteinilización. La ausencia en la BacE50-52 de lugares de unión para N-glicosilaciones precluye su existencia, pero la presencia de tres treoninas y dos serinas en su cadena aminoacídica permite la existencia de O-glicosilaciones.

#### 7.2.4. Actividad antimicrobiana frente a *Listeria* spp. de las bacteriocinas purificadas EntA y BacE50-52

Las bacteriocinas purificadas EntA (producidas por *P. pastoris* X-33EAS y *K. lactis* GG799EAS) y BacE50-52 (producidas por *P. pastoris* X-33B50-52S y *K. lactis* GG799B50-52S), se evaluaron por su actividad antimicrobiana frente a seis especies de *Listeria* y seis cepas distintas de *L. monocytogenes* y todas ellas mostraron actividad antilisteriana (**Tabla 4.5**). No obstante, la EntA purificada producida por *P. pastoris* X-33EAS mostró una actividad antilisteriana 3,7-603 veces mayor que la EntA producida por *E. faecium* T136 y 568-3.741 veces mayor que la EntA producida por *K. lactis* GG799EAS. La BacE50-52 purificada producida por *K. lactis* GG799EAS mostró una actividad antimicrobiana 5,7-28,1 veces mayor que la BacE50-52 producida por *P. pastoris* X-33BE50-52S aunque su actividad

antilisteriana fué 90-34.000 veces menor que la EntA purificada producida por *P. pastoris* X-33EAS (**Tabla 4.5**).

De los resultados obtenidos se deduce que la EntA, producida por *P. pastoris* X-33EAS, es la que manifiesta la mayor actividad antilisteriana (**Tabla 4.5**). Frecuentemente, la menor actividad antimicrobiana de las bacteriocinas producidas heterológamente suele adscribirse a deficiencias en la formación de enlaces disulfuro (Borrero y col., 2012). El hecho de que la EntA posea dos enlaces disulfuro, importantísimos para su actividad antimicrobiana (Eijsink y col., 1998), facilita que hospedadores microbianos como las levaduras, capaces de realizar modificaciones postraduccionales de manera más eficaz que las BAL, así como el correcto plegamiento de los péptidos y proteínas a secretar, produzcan péptidos antimicrobianos de elevada actividad biológica y funcional (Sorensen, 2012; Zerbs y col., 2009).

Igualmente, la menor actividad antimicrobiana de la EntA producida por *K. lactis* GG799EAS podría adscribirse a su menor producción por la levadura recombinante, a la existencia de formas truncadas de la bacteriocina y/o a la presencia de modificaciones postraduccionales, que deberían ser el objeto de futuras investigaciones. Asimismo, la actividad antilisteriana de la bacteriocina purificada BacE50-52, producida por *K. lactis* GG799B50-52S, fue 5,7-28,1 veces mayor que la producida por *P. pastoris* X-33B50-52S pero 90-1.545 veces menor que la actividad antilisteriana de la EntA producida por *P. pastoris* X-33EAS (**Tabla 4.5**). Diferencias en la susceptibilidad de *L. monocytogenes* y otras listerias a la actividad antimicrobiana de bacteriocinas de la clase IIa ya se han descrito previamente (Katla y col., 2003). Como también se conoce el reconocimiento de receptores proteicos del sistema manosa-fosfotransferasa (man-PTS) por bacteriocinas de la clase IIa, lo que determina la sensibilidad de las bacterias Gram-positivas que los codifican a su actividad antimicrobiana (Diep y col., 2007; Kjos y col., 2011). Sin embargo, un plegamiento anómalo y extensas modificaciones postraduccionales (PTM) de la EntA, producida por *K. lactis* GG799EAS y de la BacE50-52, producida por *P. pastoris* X-33BE50-52S y *K. lactis* G799B50-52, pueden ser también responsables de su menor actividad antimicrobiana.

Sin embargo, ninguna de las dos bacteriocinas purificadas (EntA y BacE50-52) manifestó actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* 4-03937, *C. perfringens* CECT821, *S. pneumoniae* FQ35, *E. coli* JM109, *S. typhimurium* CECT443, *A. salmonicida* LMG3776, *V. campbellii* LMG21363, *Y. ruckeri* LMG3279, *C. jejuni* ATCC33560 y *C. jejuni* NCTC11168. Estos resultados contrastan con la determinación de que la BacE50-52, producida por *E. faecium* NRRL B-30748, mostró actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas incluyendo *Campylobacter* spp. (Svetoch y col., 2008a; Svetoch y col., 2008b). También se ha citado que la BacE50-52 purificada, producida por *E. faecium* NRRL B-30746, mostró una masa molecular de 3.339,7 Da lo que contrasta con su masa molecular teórica de 4.125 Da (Svetoch y col., 2008a). Sin embargo, la BacE50-52 purificada, producida por *P. pastoris* X-33BE50-52S y *K. lactis* GG799BE50-52S, tampoco mostró un fragmento peptídico de la masa molecular descrita para la BacE50-52 producida por *E. faecium* NRRL B-30746. Es posible, que modificaciones postraduccionales todavía desconocidas de la BacE50-52, que compuestos sinérgicos o que transportadores

especializados de membrana, sean necesarios para que dicha bacteriocina alcance los receptores sensibles de las bacterias Gram-negativas para desarrollar su actividad antimicrobiana. La formación incorrecta de enlaces disulfuro, de plegamientos anómalos y de extensas modificaciones postraduccionales de la BacE50-52 secretada, también pueden ser responsables de la nula actividad antimicrobiana de la bacteriocina purificada frente a las bacterias Gram-negativas.

Como se deduce de los resultados de este estudio, la cepa de *P. pastoris* X-33EAS que codifica la *entA* sintética con el codon de uso para su expresión por *P. pastoris* incrementa, significativamente, la producción, actividad antimicrobiana y actividad antimicrobiana específica de la EntA en ausencia de proteínas dedicadas de secreción y de inmunidad. No obstante, este resultado contrasta con la mucho menor producción y actividad antimicrobiana de la EntA producida por *K. lactis* GG799EAS y con la escasa actividad antimicrobiana de la BacE50-52, producida por *P. pastoris* X-33BE50-52S y *K. lactis* G799BE50-52S. Todo ello permite proponer que el diseño y utilización de genes sintéticos, derivados de la secuencia aminoacídica de bacteriocinas conocidas y con la secuencia nucleotídica de uso apropiada para su expresión por otros hospedadores heterólogos, constituye una aproximación razonable a la producción de elevadas cantidades de EntA con mayor actividad antimicrobiana que la EntA producida por *E. faecium* T136. Más aún, los resultados obtenidos permiten considerar la cepa de *P. pastoris* X-33EAS como una factoría celular eficaz para la sobreproducción, recuperación y purificación de la EntA como péptido antimicrobiano natural para su utilización en la industria alimentaria, medicina humana y veterinaria, y producción animal.

No obstante, ya que la eficacia de los sistemas de expresión basados en la utilización de levaduras son difíciles de predecir, sería conveniente un mayor esfuerzo investigador para conseguir una mayor producción y expresión funcional de otros genes sintéticos derivados de la secuencia aminoacídica conocida de otras bacteriocinas, de otros péptidos antimicrobianos o de otras bacteriocinas o péptidos antimicrobianos híbridos o sus quimeras por levaduras heterólogas.

### **7.3. SUSTITUCIÓN DE LA SECUENCIA LIDER Y EVALUACIÓN DE DIVERSOS VECTORES PARA LA PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LA BACTERIOCINA ENTEROCINA A POR *Lactobacillus sakei* Lb790, *Lactobacillus plantarum* NC8 Y *Lactobacillus casei* CECT475**

#### **RESUMEN**

Dentro de las bacterias lácticas (BAL), los lactobacilos muestran un potencial cada vez mayor como cultivos iniciadores en la producción de alimentos fermentados y/o como probióticos. Más aún, los lactobacilos se consideran hospedadores celulares atractivos para la producción y distribución en el organismo humano y animal de proteínas y péptidos terapéuticos y para la producción, por fermentación de sustratos alimentarios, de péptidos bioactivos. También se conoce que los probióticos mejoran la función intestinal, ejercen

actividad inmunomoduladora e inducen protección frente a otros patógenos debido a la producción de bacteriocinas. Por ello, bacteriocinas con elevada actividad antimicrobiana y/o espectro de acción frente a microorganismos patógenos podrían producirse en cantidades elevadas por lactobacilos y contribuir al efecto probiótico de *Lactobacillus* spp. También se conoce que la enterocina A (EntA) es una bacteriocina de la clase IIa sintetizada por genes del operon *entAIFKRTD*, de los que *entA* codifica un prepeptido de 55 aminoácidos con 18 aminoácidos del péptido señal (PS<sub>EntA</sub>) y 47 aminoácidos de la bacteriocina madura (EntA). Más aún, su potente actividad antilisteriana ha catalizado el interés por su producción por BAL, sobre todo, de los géneros *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Pediococcus* y por levaduras de diversos géneros y especies. Por ello, de un elevado interés biotecnológico sería el diseño de cepas de *Lactobacillus* spp. que permitan la producción heteróloga, controlada o constitutiva, de bacteriocinas con elevada actividad antimicrobiana frente a *Listeria* spp.

Por ello, en este trabajo se ha procedido a la sustitución de la secuencia líder de la enterocina A (SL<sub>entA</sub>) por el péptido señal de la proteína Usp45 (PS<sub>usp45</sub>), así como a la clonación de fusiones génicas del PS<sub>usp45</sub> con la EntA madura más su gen de inmunidad (*entA* + *entiA*) (fragmento UAI) en los vectores de expresión proteica pSIP409 and pSIP411, bajo en control de promotores inducibles y en el vector pMG36c con un promotor constitutivo, originando los plásmidos recombinantes derivados pSIP409UAI, pSIP411UAI y pMGUAI, respectivamente. Asimismo, de los resultados de este trabajo se deduce que la producción, actividad antimicrobiana (AA) y actividad antimicrobiana específica (AAE) de la EntA producida por *Lb. sakei* Lb790, *Lb. plantarum* NC8 y *Lb. casei* CECT475 transformados con los vectores pSIP409UAI, pSIP411UAI y pMGUAI fué diferente, dependiendo del vector de expresión y de la cepa productora. Los sobrenadantes de *Lb. sakei* Lb709 (pSIP411UAI) mostraron 2,7 veces mayor producción de EntA con una AA de 2,2 veces mayor y una AAE de 1,2 veces menor, que los sobrenadantes del microorganismo control *E. faecium* T136. Sin embargo, los sobrenadantes de *Lb. casei* CECT (pSIP411UAI) mostraron 4,9 veces mayor producción de EntA con una AA 22,8 veces mayor y una AAE 4,7 veces mayor, que los sobrenadantes de *E. faecium* T136. Igualmente, los sobrenadantes de *Lb. sakei* Lb790 (pSIP411UAI) mostraron una actividad antimicrobiana de 3,8 veces menor a 2,7 veces mayor frente a diversas especies de *Listeria* incluyendo *L. monocytogenes*, mientras que los sobrenadantes de *Lb. casei* CECT475 (pSIP411UAI) mostraron una actividad antimicrobiana frente a *Listeria* spp. de 15,7 a 59,2 veces mayor que la de *E. faecium* T136, productor natural de la EntA. Por ello, *Lb. casei* CECT457 (pSIP411UAI) sobreproductor de EntA de elevada actividad antimicrobiana (AA) y elevada actividad antimicrobiana específica (AAE), debería considerarse como un lactobacilo con elevado potencial biotecnológico para la producción y expresión funcional de la bacteriocina EntA de elevada actividad antilisteriana y potencial probiótico.

### 7.3.1. Construcción de vectores de expresión derivados de los plásmidos pSIP409, pSIP411 y pMG36c

La construcción de quimeras génicas derivadas de la fusión del péptido señal de la proteína Usp45 (PS<sub>usp45</sub>) a la EntA madura (*entA*) con su gen de inmunidad (*entiA*)

(fragmento UAI) y su posterior clonación en los vectores de expresión proteica con el promotor inducible pSIP409 y pSIP411, así como en el vector de expresión proteica con el promotor constitutivo pMG36c originó los plásmidos recombinantes derivados pSIP409EA, pSIP411EA y pMGUAI, respectivamente (**Tabla 5.1**).

### **7.3.2. Producción heteróloga y expresión funcional de la EntA por *Lactobacillus* sp.**

La transferencia por transformación de los plásmidos pSIP409UAI, pSIP411UAI y pMGUAI a células competentes de diversas especies de lactobacilos permitió determinar la presencia de halos de inhibición en los aislados de *Lb. sakei* Lb790, *Lb. plantarum* NC8 y *Lb. casei* CECT475 transformados con dichos plásmidos. Más aún, el empleo de anticuerpos policlonales específicos anti-EntA y el desarrollo de un ensayo inmunoenzimático no competitivo indirecto (ELISA-NCI) permitió la detección y cuantificación (Borrero y col., 2011b) de la EntA presente en los sobrenadantes de las cepas recombinantes, mientras un ensayo de actividad en placas microtituladoras (MPA) permitió la determinación de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de las cepas productoras. Ninguna de las cepas de *Lactobacillus* spp. transformada con los vectores de expresión recombinantes sin inserto, mostró producción de EntA (**Tabla 5.3**).

Los resultados obtenidos determinaron que la producción de EntA por *Lb. sakei* Lb790 (pSIP411UAI) y *Lb. casei* CECT475 (pSIP411UAI) fueron 2,7 y 4,9 veces mayores, respectivamente, que la producción de EntA por *E. faecium* T136, mientras que la producción de EntA por *Lb. plantarum* NC8 (pSIP411UAI) fue 4,7 veces menor que la producción de EntA por *E. faecium* T136. La producción de EntA por *Lb. sakei* Lb790, *Lb. plantarum* NC8 y *Lb. casei* CECT475 transformados con pSIP409UAI o pMGUAI, fue 1,1-6,3 veces menor que la producción de EntA por *E. faecium* T136 (**Tabla 5.3**). De los resultados obtenidos se deduce que la producción, secreción y actividad antimicrobiana de la EntA producida dependen del vector de expresión y de la cepa hospedadora.

Para la producción y expresión de proteínas por *Lb. sakei* y *Lb. plantarum* pero también por otros lactobacilos, los vectores de expresión proteica conocidos como pSIP permiten la expresión de los genes de interés bajo el control de un péptido feromona añadido al medio de cultivo (Sørvig y col., 2005; Karlskås y col., 2014). Los vectores pSIP se han evaluado y utilizado en cepas de *Lb. plantarum* y *Lb. sakei* para permitir la expresión intracelular, secreción y anclaje a la superficie bacteriana de una gran variedad de proteínas (Karlskås et al., 2014). Sin embargo, ninguno de ellos se ha evaluado para determinar su eficacia en la producción heteróloga y expresión funcional de bacteriocinas por lactobacilos. En los vectores pSIP la expresión de los genes de interés procede de vectores con promotores del gen estructural de la bacteriocina sakacina P ( $P_{sppA}$ ) o sakacina Q ( $P_{sppQ}$  o también  $P_{orfX}$ ), con un lugar de inserción *NcoI* para fusiones traduccionales y con los componentes del sistema de regulación de transducción de señales de dos componentes (SppK y SppR) de respuesta a la adición del péptido feromona (SppIP). Dichos vectores también disponen de un lugar de clonación múltiple (MCS) y de un replicón con un rango de hospedadores pequeño derivado

del plásmido p256 (pSIP409) o de un replicón que permite un mayor número de copias y un rango más amplio de hospedadores, derivado del plásmido pSH71 (pSIP411) (Sørvig y col., 2005). El vector de expresión pMG36c contiene el origen de replicación de bajo número de copias del plásmido pWV01 y el promotor P<sub>32</sub>, que promueve la transcripción constitutiva de los genes clonados en el lugar de clonación múltiple (MCS) del plásmido pUC18 (van de Guchte y col., 1989).

De interés en este trabajo es la producción de EntA por *Lb. sakei* Lb790 (pSIP411UAI) y *Lb. casei* CECT475 (pSIP411UAI) que es 2,7 y 4,9 veces mayor, respectivamente, que la producción de EntA por el resto de *Lactobacillus* spp. y por *E. faecium* T136 (**Tabla 5.3**). Por ello, la producción de EntA por lactobacilos debe depender, entre otros factores, de la estabilidad de los vectores y de las diferencias en el número de copias entre los vectores pSIP409, pSIP411 and pMG36c pero, también, de las características de los promotores que dirigen la expresión génica. Se conoce que para la optimización de la producción de péptidos y proteínas los sistemas inducibles son, generalmente, más eficaces que los constitutivos debido a que actúan durante menos tiempo lo que reduce la adhesión de la EntA a la pared celular de las bacterias productoras, reduce la formación de agregados y reduce su hidrólisis por proteasas (Gutiérrez y col., 2005). El mayor número de copias del replicón del vector pSIP411 posiblemente contribuya, también, a la mayor producción de EntA por los lactobacilos transformados con el vector pSIP411UAI en vez de con el vector pSIP409UAI.

No obstante, también puede ocurrir que el péptido señal PS<sub>usp45</sub> module de manera diferente la secreción de EntA por las células recombinantes de *Lb. sakei* Lb790, *Lb. plantarum* NC8 and *Lb. casei* CECT47 como se ha comprobado con la producción de EntA y otras bacteriocinas por otras BAL (Borrero et al., 2011b; Jiménez et al., 2013). También puede suceder que la EntA madura permanezca asociada a la pared celular de las células productoras debido a que el PS reconocible por el sistema Sec-dependiente del productor no se elimina durante su secreción (Bøhle et al., 2011). Un plegamiento anómalo de la EntA en el citoplasma de la célula productora también puede mantener el prepéptido en una conformación incompetente para su secreción (Mathiesen et al., 2009). Es también posible que las diferencias observadas en la secreción de bacteriocinas por diferentes hospedadores puedan también deberse a factores post-transcripcionales como diferencias en el codon de uso del gen insertado, estabilidad del mRNA y eficacia de la traducción, lo que puede reducir significativamente la producción de EntA por *Lb. sakei* Lb790 y *Lb. plantarum* NC8 cuando se compara con la producción de EntA por *Lb. casei* CECT475 (Diep et al., 2009b).

De los resultados de este trabajo también se deduce que de los recombinantes derivados de *Lb. sakei* Lb709, sólo *Lb. sakei* Lb790 (pSIP411UAI) mostró una actividad antimicrobiana (AA) 2,2 veces mayor pero una actividad antimicrobiana específica (AAE) 1,2 veces menor, que la EntA producida por *E. faecium* T136. Todos los recombinantes derivados de *Lb. plantarum* NC8 mostraron una AA y AAE menores que la del microorganismo control productor de EntA. Sin embargo, todos los recombinantes derivados de *Lb. casei* CECT475 generaron sobrenadantes con una AA y AAE mayor que los de *E. faecium* T136. Y de gran interés, es la elevada AA (22,8 veces mayor) y AAE (4,7 veces

mayor) de los sobrenadantes de *Lb. casei* CECT475 (pSIP411UAI) comparados con los de *E. faecium* T136 (**Tabla 5.3**).

Y la menor actividad antimicrobiana (AA) y actividad antimicrobiana específica (AAE) de la EntA producida por las cepas recombinantes de *Lb. sakei* Lb790 y *Lb. plantarum* NC8 podría deberse a numerosos factores, difíciles de determinar. Por ello, es posible que: (i) mecanismos reguladores del estrés por secreción activen redes de control de las células productoras que involucren un mayor plegamiento de la bacteriocina producida y una mayor producción de proteasas encargadas de quehaceres de limpieza intracitoplásmicos (del inglés, *housekeeping proteases*) (Darmon y col., 2002), (ii) diferencias en los sistemas de procesamiento y secreción Sec-dependientes y en el plegamiento y modificaciones conformacionales de las bacteriocinas a formas extracelulares menos activas, que pueden ser responsables de la reducción en la actividad antimicrobiana de la EntA secretada (Sarvas y col., 2004), (iii) la secreción de bacteriocinas truncadas que puede también reducir la actividad antimicrobiana de las BAL productoras de bacteriocinas (Jiménez y col., 2013), (iv) la formación correcta o incorrecta de enlaces disulfuro entre los cuatro residuos de cisteína de la EntA que puede también jugar un papel importante en el plegamiento, integridad estructural y actividad antimicrobiana de la bacteriocina producida (Freitas y col., 2005), (v) la EntA contiene una metionina en su secuencia aminoacídica cuya oxidación a sulfóxido de metionina puede originar una forma conformacionalmente menos activa de la bacteriocina madura (Johnsen y col., 2000) y, finalmente, (vi) diferencias en el plegamiento y la agregación de las bacteriocinas entre si o a otros componentes del medio de cultivo pueden ser también responsables de la menor AA y AAE de la EntA producida por cepas genéticamente modificadas de *Lb. sakei* Lb790 y *Lb. plantarum* NC8 (Borrero y col., 2011b).

Por ello, aunque *Lb. sakei* and *Lb. plantarum* se han considerado hospedadores apropiados para la producción heteróloga de un número elevado de péptidos, proteínas y enzimas (Halbmayer et al., 2008; Bömer et al., 2012; Morais et al., 2013; Karlskås et al., 2014), los resultados de este trabajo sugieren que *Lb. casei* CECT475 es el hospedador más adecuado para la producción heteróloga y expresión funcional de la bacteriocina EntA.

### **7.3.3. Purificación de la EntA y análisis de su tamaño molecular por espectrometría de masas**

La purificación a homogeneidad de la EntA producida por *Lb. sakei* Lb790 (pSIP411UAI) y *Lb. casei* CECT475 (pSIP409UAI), permitió la determinación de su masa molecular por espectrometría de masas (MALDI-TOF MS). De los resultados obtenidos se deduce que la EntA purificada, producida por *Lb. sakei* Lb790 (pSIP411UAI), muestra un fragmento peptídico mayoritario de 4,842.62 Da (**Fig 5.1.A**) prácticamente idéntico al de la EntA producida por diversas levaduras recombinantes (Borrero y col., 2012), mientras que la EntA purificada, producida por *Lb. casei* CECT475 (pSIP411UAI), mostró la presencia de fragmentos peptídicos de diverso tamaño molecular entre los que se observó un fragmento de 4,844,53 Da (**Fig 5.1.B**), casi idéntico al de la masa molecular de la EntA (4,844,40 Da) producida por *E. faecium* (Borrero y col., 2011b). En ambas purificaciones, el fragmento

peptídico detectado de 4,860.2 Da puede corresponder a la oxidación (+16 Da) de la metionina (Met<sup>33</sup>) a sulfóxido de metionina (MetSO) (**Fig 5.1**). La visualización en la EntA purificada, producida por *Lb. casei* CECT475 (pSIP411UAI), de fragmentos peptídicos de diverso tamaño molecular permite sugerir que la EntA no se ha purificado a homogeneidad o que dichos péptidos son responsables de la pequeña actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de *Lb. casei* CECT475 (**Fig 5.1.B**). Sin embargo, el tratamiento de los sobrenadantes de *Lb. casei* CECT474 con proteinasa K (1 mg/ml) permitió determinar que la actividad antimicrobiana de dichos sobrenadantes no se debe a un metabolito o compuesto de naturaleza proteica.

#### 7.3.4. Actividad antimicrobiana frente a *Listeria* spp. de los sobrenadantes de las cepas productoras de bacteriocinas

Los sobrenadantes de las cepas recombinantes derivadas de *Lb. sakei* CECT475 y productoras de EntA mostraron, frente a 5 *Listeria* spp. y 6 cepas de *L. monocytogenes* una actividad antimicrobiana de hasta 59,2 veces mayor que frente a los sobrenadantes de otras cepas recombinantes derivadas de *Lb. sakei* Lb790 o *Lb. plantarum* NC8 (**Tabla 5.4**).

Por ello, la cepa de *Lb. casei* CECT (pSIP411UAI) sobreproductora inducible de la EntA y con una mayor actividad antimicrobiana (AA) y actividad antimicrobiana específica (AAE) que la de *E. faecium* T136, debería considerarse como una factoría celular y una alternativa eficaz a *E. faecium* T136 para la producción y purificación de EntA con elevada actividad antilisteriana. Más aún, la producción controlada (inducible) o constitutiva de EntA por *Lb. casei* CECT475, también descrito en otras colecciones como *Lb. casei* ATCC393, podría permitir evaluar la actividad antimicrobiana y, sobre todo, antilisteriana de este microorganismo en el contexto de otras de sus capacidades biotecnológicas como su utilización como cultivo iniciador durante la producción de productos cárnicos fermentados curados (Sayas-Barbera et al., 2012; Sidira et al., 2014), en la liberación de péptidos antitrombóticos y péptidos inhibidores de la enzima convertora de la angiotensina (PI-ECA) durante su desarrollo en caseína bovina (Rojas-Ronquillo et al., 2012) o durante la utilización de *Lb. casei* CECT475 para la producción péptidos antioxidantes y antimutagénicos en yogurt (Sah et al., 2014).

La utilización de las cepas de *Lb. casei* CECT475, reconocidas como seguras (GRAS) y con la presunción cualificada de seguridad (QPS), como factorías celulares de producción de bacteriocinas también podría constituir un medio por el que los beneficios potenciales de las bacteriocinas como péptidos antimicrobianos naturales podrían explotarse por la industria alimentaria, en medicina humana y veterinaria, y en producción animal. La utilización combinada de *Lb. casei* CECT475 como el microorganismo hospedador y del plásmido pSIP411 como el vector de expresión proteica, también merecen reconocimiento como un sistema eficaz de expresión génica para la sobreproducción y expresión funcional de EntA por *Lb. casei*.



#### **7.4. *Enterococcus faecalis* DBH18, UN ENTEROCOCO CON POTENCIALES APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS CODIFICA LOS GENES PRODUCTORES DE BACTERIOCINAS *efl097* Y *entL50A-entL50B* Y GENES SIMILARES A LOS *entL50A-entL50B* DENOMINADOS *entJSA* Y *entJSB*.**

##### **RESUMEN**

Los enterococos son bacterias lácticas (BAL) con un destacado papel en el desarrollo de las cualidades organolépticas en los alimentos y, además, se emplean como cultivos iniciadores por la industria alimentaria y como probióticos en personas y animales. Los enterococos son también productores de bacteriocinas, péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal denominados enterocinas, lo que debido a su amplio espectro de acción les permite competir con otros microorganismos cuando colonizan diversos nichos ecológicos. Las enterocinas producidas por enterococos han atraído la atención de la comunidad científica internacional debido a su potencial como conservadores naturales de los alimentos así como por sus posibles aplicaciones en la industria farmacéutica, médica y veterinaria. De la misma manera, las bacteriocinas y también las enterocinas producidas por enterococos se consideran responsables, en parte, del potencial probiótico de muchos microorganismos debido a que: a) pueden facilitar el predominio de un probiótico respecto de otros microorganismos en un determinado nicho ecológico, b) pueden controlar infecciones microbianas y c) pueden actuar como moléculas señalizadoras de respuestas inmunes en el organismo hospedador. Aunque existe alguna controversia respecto a su clasificación, la más aceptada agrupa a las enterocinas producidas por enterococos en lantibióticos (clase I), no lantibióticos (clase II), circulares (clase III) y proteínas de elevado tamaño molecular (clase IV).

Los enterococos colonizadores del tracto gastrointestinal (GI) se consideran desde microorganismos simbioses hasta patógenos resistentes a antibióticos, responsables de infecciones nosocomiales. Sin embargo, el empleo de técnicas genéticas y moleculares permite el desarrollo de herramientas para la producción heteróloga y expresión funcional de péptidos y proteínas con actividad antimicrobiana en microorganismos diferentes a los productores. Por ello, el empleo de enterocinas producidas por enterococos con elevada actividad antimicrobiana y amplio espectro de acción como preparados libres de células u obtenidas mediante su producción y expresión funcional por microorganismos reconocidos como seguros (QFS o GRAS), se antoja una estrategia interesante y factible para su evaluación como péptidos antimicrobianos eficaces para su empleo en los alimentos, medicina humana y veterinaria, y en producción animal.

En este trabajo se ha demostrado que *E. faecalis* DBH18, un microorganismo productor de bacteriocinas aislado de ánades reales (*Anas platyrhynchos*), codifica los genes productores de bacteriocinas *efl097* y *entL50A-entL50B* y genes similares a los *entL50A-entL50B* denominados *entJSA* y *entJSB*, codificados éstos últimos en un posible operon con doce marcos de lectura abiertos (ORF). Para determinar la presencia de genes que codifiquen bacteriocinas, el ADN purificado de *E. faecalis* DBH18 se amplificó por PCR con cebadores derivados del gen *efl097*, que codifica la enterococcina V583 (EntV583) producida por *E.*

*faecalis* V583 y con cebadores derivados de los genes *entL50A-entL50B*, que codifican la enterocina L50 (EntL50A y EntL50B) producida por *E. faecium* L50. La secuenciación nucleotídica de los fragmentos génicos amplificados confirmó la presencia de dichos genes, así como de un gen similar al *entL50B*, denominado *entJSB*. Los resultados generados también confirmaron que mientras los genes *entL50A-entL50B* fueron idénticos en *E. faecium* L50 y *E. faecalis* DBH18, su localización puede ser diferente en ambos microorganismos. Igualmente, la secuenciación nucleotídica por genética inversa de los genes adyacentes al gen *entJSB* de *E. faecalis* DBH18, reveló doce marcos de lectura abiertos incluyendo los genes *entJSA-entJSB*. Los ensayos realizados para la determinación de la actividad antimicrobiana de los productos de los genes *entL50B*, *entL50A*, *entJSA* y *entJSB*, obtenidos por técnicas genéticas *in vitro*, demostraron que: (i) los genes *entJSA* y *entJSB* son necesarios para la producción y expresión funcional de la enterocina JS (EntJAS y EntJSB), (ii) que EntL50A y EntL50B manifiestan una mayor actividad antimicrobiana que EntJSA y EntJSB y, (iii) que la actividad antimicrobiana de EntL50A, EntL50B, EntJSA y EntJSB depende de la actividad antimicrobiana y sinergia de los péptidos individuales. Por último, la determinación del tamaño molecular por espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) de las enterocinas purificadas de los sobrenadantes de *E. faecalis* DBH18, sugieren la presencia de una metionina formilada en la secuencia aminoacídica N-terminal de la EntJSA y EntJSB.

#### **7.4.1. Amplificación por PCR y secuenciación de los genes de *E. faecium* L50 y *E. faecalis* DBH18 productores de bacteriocinas**

La amplificación por PCR del ADN genómico purificado de *E. faecium* L50 y *E. faecalis* DBH18 con los cebadores EF1097-F3 y EF1097-R3 demostró que, solamente el ADN purificado de *E. faecalis* DBH18 permitía la amplificación de un fragmento de 468-pb (resultados no mostrados). Igualmente, la secuencia nucleotídica del fragmento de 468-pb se reveló idéntica a la del gen *efl097* de *E. faecalis* V583 con modificaciones en la posición de cuatro nucleótidos sin originar modificaciones en su secuencia aminoacídica y la sustitución de una G por una A, lo que modifica la secuencia aminoacídica de la proteína madura EF1097 (enterococcina V583) debido a la sustitución del aminoácido triptófano (TGG) por un triplete de terminación de la transcripción (TGA). Esta modificación no se detectó en la secuencia nucleotídica del gen *efl097* de otros aislados de *E. faecalis* (cepas JH2-2, DBH9 y DCH9) (Sánchez y col., 2007a) previamente examinados por otros miembros de nuestro grupo investigador. Aunque el gen *efl097* se ha determinado en otras cepas de *E. faecalis* (cepas DBC5, DCH9, DAC10, DBC16, DCC32, DAC9, DBH9, DBC4, and DEC23) aislados de ánades reales, ninguno de ellos manifestó una actividad antimicrobiana medible en sus sobrenadantes libres de células (Sánchez y col., 2007a).

Numerosas BAL carecen de actividad antimicrobiana en sus sobrenadantes aunque codifiquen genes responsables de su síntesis, lo que sugiere la existencia de genes implicados en la regulación de su producción o expresión funcional (Lux y col., 2007; Sánchez y col., 2007a). No obstante, la secuencia nucleotídica del gen *efl097* de *E. faecalis* DBH18 manifiesta una modificación genética que conlleva la presencia de un codón de terminación de la transcripción en el residuo aminoacídico 99 de los 136 de los que consta la EntV583

madura. Es posible que dicho codon de terminación pueda ser responsable de la considerable disminución de la actividad antimicrobiana de la proteína sintetizada. No obstante, también se conoce que la producción y expresión funcional de la EntV583 madura se encuentra fuertemente regulada en los enterococos, lo mismo que la producción y expresión de algunos de sus factores potenciales de virulencia (Bourgogne y col., 2006; Swe y col., 2007).

Igualmente, la amplificación con los cebadores EntL50-R1 y EntL50-R2 del ADN genómico purificado de *E. faecium* L50 y *E. faecalis* DBH18 demostraron que el ADN genómico de *E. faecium* L50 permitía la amplificación de un único fragmento de 286-pb mientras que el de *E. faecalis* DBH18 permitía la amplificación de un fragmento de 286-pb y, de otro más corto, de unos 130-pb (**Figura 6.1.A y B**). La secuenciación nucleotídica del fragmento de 286-pb de *E. faecium* L50 y *E. faecalis* DBH18 permitió la identificación de una secuencia idéntica a la *entL50A-entL50B* en ambas cepas. Sin embargo, la secuenciación nucleotídica del fragmento de menor tamaño (130-pb), amplificado de *E. faecalis* DBH18, mostró una secuencia de 132-pb similar, pero no idéntica, a la *entL50B* de *E. faecium* L50, denominada *entJSB*. El gen *entJSB* codifica un péptido de 43 aminoácidos con una secuencia nucleotídica similar a la *entL50B*, incluyendo cambios en la secuencia nucleotídica que conducen a modificaciones de los aminoácidos en la posición 9 y 15 de la EntJSB, con sustituciones de una alanina (GCA) por treonina (ACA) y de una fenilalanina (TTT) por leucina (CTA), respectivamente (**Figura 6.4.B**). La determinación de la secuencia nucleotídica del fragmento de 400-pb, procedente de la amplificación del ADN genómico purificado de *E. faecium* L50 y *E. faecalis* DBH18 con los cebadores L50J40-F y L50J40-R, confirmó que los genes *entL50A-entL50B* comparten una secuencia nucleotídica idéntica en ambas cepas. Sin embargo, la amplificación por PCR anidada del ADN genómico de *E. faecalis* DBH18 y *E. faecium* L50 con parejas de cebadores deducidas de la secuencia nucleotídica de *entL50A-entL50B* y de los ORFs adyacentes a los genes *entL50A-entL50B* de *E. faecium* L50, sugieren que los genes adyacentes a *entL50A-entL50B* no son los mismos en ambas cepas o se encuentran en localizaciones genéticas diferentes (**Figura 6.2.A y Figura 6.2.B**).

Estudios recientes avalan la elevada frecuencia con la que los genes estructurales de la EntL50 se encuentran en enterococos aislados de nichos ecológicos y lugares geográficos diferentes (Strompfová y col, 2008; Brandão y col., 2010). La amplia distribución de los genes que codifican enterocinas podría deberse a la facilidad con la que los enterococos incorporan material genético de bacterias de diferentes géneros y especies (Murray y col., 1986). Se conoce que plásmidos conjugativos y no conjugativos, así como transposones facilitan la transferencia de genes entre enterococos (Clewell, 1990). En consecuencia, de elevado interés científico sería también la determinación de la secuencia nucleotídica de los genes adyacentes a *entL50A-entL50B* de *E. faecalis* DBH18, los cuales podrían estar implicados en el procesamiento, transporte y secreción de la EntL50 (EntL50A y EntL50B) y/o en su movilidad o transferencia entre enterococos de nichos ecológicos y lugares geográficos diferentes.

### 7.4.2. Secuenciación de genes similares a *entL50A-entL50B* y de sus genes adyacentes en *E. faecalis* DBH18

La secuenciación del ADN genómico de *E. faecalis* DBH18 a partir de la secuencia nucleotídica conocida del gen *entJSB* por técnicas de genética inversa, permitió la determinación de una secuencia de 11.456-pb incluyendo dos genes similares a *entL50A-entL50B*, denominados *entJSA-entJSB* y otros 10 marcos de lectura abiertos (ORFs) en la misma hebra y dirección de transcripción que los genes *entJSA-entJSB* (**Tabla 6.2 y Figura 6.5**). El gen *entJSA* finaliza unos 20-pb hacia arriba de *entJSB* y codifica un péptido de 44 aminoácidos con una secuencia similar a la de *entL50A*, excepto por 7 nucleótidos diferentes y la sustitución de una T por una G, lo que modifica la síntesis del aminoácido en posición 38 de la EntJSA madura que pasa de ácido aspártico (GAT) a ácido glutámico (GAG) (**Figura 6.4.B**). Asimismo, comparando la secuencia de *entJSA-entJSB* con la de otros genes en bases de datos informatizadas se determinó que ambos eran idénticos a los genes *entNA-entNB* (100% de identidad, GenBank AB292312) de *E. faecalis* N1-33, aislado de vegetales fermentados. Los genes *entJSA-entJSB* también mostraron una elevada similitud con los genes *mr10A-mr10B* (99% de identidad, GenBank DQ366596) de *E. faecalis* MRR 10-3, aislado de la glándula uropigial de la abubilla (*Upupa epops*) (Martín-Platero y col., 2006); con los genes *ent62-A-ent62-B* (93% de identidad, GenBank EF112398) de una cepa vaginal de *E. faecium* 62-6; con los genes *entI-entJ* (92% de identidad, GenBank DQ198088) de *E. faecium* 6T1a aislado de aceitunas fermentadas (Floriano y col., 1998) y con los genes *entL50A-entL50B* (92% de identidad, GenBank AJ223633) de *E. faecium* L50, aislado de un embutido crudo curado (Cintas y col., 1998a) (**Tabla 6.2 y Figura 6.4.A**). Todas las bacteriocinas citadas se encuentran codificadas por dos genes organizados linealmente y separados por una breve región intergénica (<30-bp), presumiblemente en una única unidad de transcripción.

Los 10 marcos de lectura abiertos (ORFs) localizados adyacentes a *entJSA-entJSB* se identificaron como *orf1* el primero y tras los *orf2* (*entJSA*) y *orf3* (*entJSB*), se numeraron del *orf4* al *orf12* (**Tabla 6.29**). El gen *orf1* codifica una proteína con un 99% de identidad con los 609 aminoácidos de la proteína estafopaína C47 (GenBank EFU12852.1) de *E. faecalis* TX1341, aislado del tracto gastrointestinal humano. La enzima estafopaína C47 es una peptidasa estafilocócica del grupo de las cisteína-proteasas, las cuales son utilizadas por las bacterias para degradar proteínas del sistema inmune del organismo hospedador y para desarrollarse y sobrevivir en sistemas hostiles originando infecciones (Potempa y Pike, 2009). También se ha determinado que estas peptidasas se encuentran codificadas en elementos genéticos movilizables, quizás como mecanismo evolutivo para permitir su transferencia a otras bacterias de la flora intestinal humana habitual (Thornton y col., 2010). Su presencia en *E. faecalis* DBH18 podría sugerir un mecanismo común de transferencia de estas peptidasas entre bacterias. Igualmente, los genes *orf4*, *orf5* y *orf6* se localizan 221-pb, 491-pb y 773-pb hacia abajo, respectivamente, del codón de terminación de *entJSB* y codifican proteínas de 89, 89 y 139 aminoácidos, respectivamente. Los genes *orf4*, *orf5* y *orf6* muestran una elevada homología con los genes *orfE*, *orfF* y *orfG* de pCIZ1, el plásmido que codifica la enterocina L50 (EntL50A y EntL50B) de *E. faecium* L50 (Cintas y col.,

1998a) y con los genes *L50E*, *L50F* y *L50G* de pEF1, el plásmido que codifica la enterocina I y enterocina J de *E. faecium* 6T1a (Ruiz-Barba y col., 2007), enterocinas idénticas a la EntL50A y EntL50B. Es posible que los ORFs descritos codifiquen transportadores del tipo ABC involucrados en el procesamiento, transporte y secreción de péptidos y proteínas en muchas especies bacterianas (Cintas y col., 1998a; Ruiz-Barba y col., 2007). El gen *orf7* se encuentra situado 1.180-pb hacia abajo del codón de terminación de *entJSB* y codifica una proteína hipotética, sin función conocida, de 458 aminoácidos con homología con otras codificadas por genes identificados en las cepas de *E. faecium* E980 y *E. faecium* L50. Seguidamente, los genes *orf8*, *orf9*, *orf10* y *orf11* se localizan 2.566-pb, 3.050-pb, 4.267-pb y 4.947-pb hacia abajo del codón de terminación de *entJSB* y codifican proteínas hipotéticas de 163, 406, 227 y 399 aminoácidos. Las proteínas citadas muestran una elevada homología con (a) un ABC transportador de tres subunidades (dos subunidades transmembrana y una subunidad ATPasa) y una proteína accesoria descritas en el plásmido pCIZ1 (Criado, 2006c), (b) con el ABC transportador *as-48EFGH* de *E. faecalis* S-48 (Díaz y col., 2003), y (c) con un posible ABC-transportador codificado por los genes *orf11*, *orf12*, *orf13* y *orf14* en el plásmido pEF1 de *E. faecium* 6T1a (Ruiz-Barba y col., 2007) (**Figura 6.5**).

#### 7.4.3. Experiencias de transcripción/traducción *in vitro* de los genes *entJSA-entJSB* de *E. faecalis* DBH18

Debido a que la purificación de los péptidos codificados por los genes *entJSA-entJSB* de *E. faecalis* DBH18 y con elevada homología con los *entL50A-entL50B* de *E. faecium* L50, habría resultado difícil mediante el empleo de columnas cromatográficas de separación de péptidos y proteínas, la actividad antimicrobiana del producto de los genes *entJSA-entJSB* se determinó mediante un ensayo combinado de transcripción/traducción *in vitro*. Para ello, los plásmidos pETBlueJSA y pETBlueJSB que codifican los genes *entJSA* y *entJSB*, respectivamente, y los plásmidos pRSETB-*entL50A* y pRSETB-*entL50B* que codifican los genes *entL50A* y *entL50B*, respectivamente (Cintas y col., 1998a), se emplearon como ADN molde para la síntesis *in vitro* de los péptidos EntJSA, EntJSB, EntL50A y EntL50B. La actividad antimicrobiana de los péptidos sintetizados se evaluó individualmente o combinados en una proporción 1:1 (v/v) (**Tabla 6.3**). Los productos de los genes *entJSA* (EntJSA) y *entJSB* (EntJSB) mostraron actividad antimicrobiana, tanto individualmente como combinados con EntL50A y EntL50B (**Tabla 6.3** y **Figura 6.3**). Las combinaciones de EntL50A con EntL50B y de EntJSA con EntJSB mostraron un claro efecto sinérgico frente al microorganismo indicador *P. damnosus* CECT4797, mientras las combinaciones de EntL50A, EntL50B y EntJSA y las de EntL50A, EntL50B y EntJSB, también mostraron un efecto sinérgico frente a *Lb. buchneri* CECT4674. El empleo de *P. acidilactici* 347 como microorganismo indicador también permitió determinar un efecto sinérgico de la EntL50A en combinación con las otras bacteriocinas, excepto cuando la EntL50A se utilizaba con la EntJSA, en cuyo caso la actividad antimicrobiana fue menor en comparación con la actividad de ambas bacteriocinas solas (**Tabla 6.3**). De interés fue el reconocimiento de que los péptidos EntJSA y EntJSB, sintetizados *in vitro*, mostraron actividad antimicrobiana por sí mismos, lo cual sugiere que los genes *entJSA* y *entJSB* constituyen el requisito mínimo para la síntesis, producción y actividad biológica de los péptidos antimicrobianos EntJSA y

EntJSB, respectivamente. En otros trabajos se ha determinado que la EntL50A es más activa que la EntL50B (Cintas y col., 1998a; Izquierdo y col., 2008). Por el contrario, de los resultados de este trabajo se observa que la EntJSB mostró una mayor actividad antimicrobiana que la EntJSA, aunque la actividad individual de ambas bacteriocinas fue menor que la de EntL50A y EntL50B. El efecto sinérgico de la EntL50A-EntL50B y de la EntJSA-EntJSB fue similar, a pesar de que la actividad antimicrobiana de la primera pareja de bacteriocinas era mayor que el de la segunda.

#### **7.4.4. Purificación de las bacteriocinas producidas por *E. faecalis* DBH18, análisis por espectometría de masas (MALDI-TOF MS) y mapeo peptídico**

El análisis por MALDI-TOF MS de las bacteriocinas purificadas a homogeneidad producidas por *E. faecalis* DBH18, así como los valores monoisotópicos ( $m/z$ ) calculados para la EntJSA (5.201,9), EntJSB (5.207,8), EntL50A (5.215,3) y EntL50B (5.232,2), sugieren la presencia en las muestras de bacteriocinas con su región N-terminal formilada (**Figura 6.6**). En las eubacterias, la metionina formilada es el primer aminoácido en los péptidos sintetizados y se elimina mediante un proceso denominado excisión de la metionina de la región N-terminal (del inglés, “N-terminal Met excision”) debido a la acción de un péptido con actividad deformilasa y de una aminopeptidasa que reconoce la metionina (complejo PDF/MAP). Debido a que las bacteriocinas sin secuencia líder son hidrofóbicas en su región N-terminal y se secretan al exterior celular, es posible que dicha región esté protegida frente a la acción del complejo PDF/MAP (Liu y col., 2011). No obstante, otras bacteriocinas sin secuencia líder como la EntL50A y EntL50B y la Ent7A y Ent7B presentan la metionina formilada y protegida frente a deformilaciones (Fujita y col., 2007; Izquierdo y col., 2008; Liu y col., 2011). Los fragmentos resultantes de la digestión con tripsina de las bacteriocinas purificadas de *E. faecalis* DBH18 permitieron, igualmente, la identificación de los precursores IIDWIK, FGWPFIKK y FGWPFIKK derivados específicamente de la EntJSA y EntJSB, así como de los precursores FGWPIVK, QIMQFIGEGWAINK y QIMQFIGQGWTIDQIEK, derivados de la EntJSA/EntL50A y EntJSB/EntL50B (**Figura 6.4**).

#### **7.4.5. Producción de bacteriocinas y actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de *E. faecalis* DBH18 y *E. faecium* L50**

La identificación y cuantificación de la producción de bacteriocinas en los sobrenadantes de *E. faecium* L50 y *E. faecalis* DBH18, se determinó mediante el empleo de anticuerpos policlonales frente a las bacteriocinas EntL50A y EntL50B (Criado y col., 2006b) y un ensayo inmunoenzimático (NCI-ELISA) (**Tabla 6.4**). De los resultados obtenidos, se deduce que mientras *E. faecium* L50 produce las enterocinas EntL50A y EntL50B en cantidades similares, la producción de EntL50A por *E. faecalis* DBH18 fue 2,2 veces inferior a la de *E. faecium* L50 mientras que la de EntL50B (EntL50B y EntJSB) fue 6,6 veces mayor que por *E. faecium* L50. Conviene conocer que los anticuerpos empleados en este estudio se diseñaron frente a los aminoácidos 32 a 44 y 32 a 43 de la región C-terminal de EntL50A y EntL50B de *E. faecium* L50, respectivamente (Criado y col., 2006b). Por ello, la diferencia

en el residuo aminoacídico 38 entre la EntL50A y la EntJSA podría ser la razón del escaso o nulo reconocimiento de la EntJSA por los anticuerpos policlonales anti-EntL50A, utilizados en este estudio. Por otro lado, la diferencia entre dos residuos aminoacídicos (residuos 9 y 15) entre la EntL50B y la EntJSB no debería afectar el reconocimiento de ambos péptidos por los anticuerpos anti-EntL50B. Por ello, el que la producción de EntL50A y EntL50B por *E. faecium* L50 sea similar sugiere que ambos péptidos se transcriben de una misma unidad de transcripción (Cintas y col., 1998a). Sin embargo, la producción de EntL50A por *E. faecalis* DBH18 fue inferior a la de *E. faecium* L50, mientras la producción de EntL50B (EntL50B y EntJSB) fue más elevada por el primero que por el segundo. Actualmente se conoce que la sustitución de un sólo aminoácido en un péptido o proteína determina mayores o menores rendimientos de secreción de ambos por *Bacillus subtilis* (Nijland y col., 2007). Por ello, es posible que diferencias en la secuencia aminoacídica de la EntJSB en comparación con la EntL50B, permitan una secreción más eficiente de la EntJSB por *E. faecalis* DBH18. También es muy interesante observar que *E. faecalis* DBH18 produce la EntL50A y la EntL50B (EntL50B y EntJSB), ya que otros estudios han demostrado que *E. faecium* DCH2 y *E. faecium* DCC14 que codifican los genes *entL50A*, *entL50B* y *entA*, fueron silentes para la producción de EntL50A, EntL50B y EntA (Sánchez y col., 2007a).

En este trabajo también se han evaluado la actividad antimicrobiana y espectro de acción de los sobrenadantes de *E. faecalis* DBH18 y *E. faecium* L50 frente a diversas BAL y otras bacterias alterantes y patógenas de los alimentos (**Tabla 6.5**). La actividad antimicrobiana de *E. faecalis* DBH18, comparada con la de *E. faecium* L50 fue superior frente a microorganismos de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* y *Enterococcus* pero no frente a los géneros *Propionibacterium*, *Clostridium*, *Listeria* y *Staphylococcus*, lo que podría deberse a la diferente sensibilidad de los microorganismos evaluados frente a distintas combinaciones de las enterocinas EntL50A, EntL50B, EntJSA y EntJSB (**Tabla 6.5**). Los resultados obtenidos también podrían deberse a que la producción de bacteriocinas suele estar regulada y algunas sólo se producen bajo condiciones idóneas de crecimiento (Strompfová y col, 2008). La temperatura de crecimiento también parece influir en la producción de bacteriocinas, al menos, en *E. faecium* L50 (Cintas y col., 2000c). El diferente plegamiento de las bacteriocinas, su diferente sensibilidad a las proteasas, la formación de agregados de bacteriocinas entre sí o con componentes del medio de cultivo, la producción adicional de otras bacteriocinas y otros fenómenos, todavía no bien evaluados, que afectan a las características bioquímicas de las bacteriocinas producidas, también podrían justificar la diferente actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de *E. faecalis* DBH18 respecto de los de *E. faecium* L50.

Los resultados obtenidos también demuestran que *E. faecalis* DBH18 codifica bacteriocinas producidas por otras cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* de origen alimentario, clínico o ambiental, lo que sugiere que algunas enterocinas se producen por enterococos no relacionados en cuanto a su especie o el nicho ecológico y lugar geográfico de procedencia de la cepa productora. Además, este trabajo también confirma que la producción de múltiples bacteriocinas puede ser un rasgo común de los enterococos (Nes y col., 2007; Strompfová y col., 2008; Brandão y col., 2010). Sin embargo, ya que *E. faecalis* DBH18 codifica factores

potenciales de virulencia (Sánchez y col., 2007a), dicho microorganismo puede ser preocupante como productor de bacteriocinas por su potencial patogenicidad en personas inmunodeprimidas o con enfermedades subyacentes. Por ello, en aras de establecer buenas prácticas microbiológicas debería evitarse la ingestión de alimentos que contengan enterococos con factores potenciales de virulencia y con elevada actividad antimicrobiana y espectro de acción. Consecuentemente, sería recomendable que los ánades reales y otras especies de caza menor se eviscerasen y desplumasen con suficiente antelación antes de su consumo (Martín y col., 2006; Sánchez y col., 2007a). No obstante, algunas de las enterocinas descritas en este trabajo podrían evaluarse como agentes naturales antimicrobianos de alimentos y piensos y en posibles aplicaciones farmacéuticas, veterinarias y médicas. Por ello, la evaluación de la producción, regulación, inmunidad, secreción y movilización de la enterocina Sec-dependiente EntV583 y de las enterocinas EntL50A, EntL50B, EntJSA y EntJSB, producidas por *E. faecalis* DBH18, constituye un interesante reto científico en aspectos de salud pública, microbiología de los alimentos y en el área de trabajo de las bacteriocinas. Igualmente, la enterocina JS (EntJSA y EntJSB) podría considerarse como una variante genética de la enterocina L50 (EntL50A y EntL50B), lo cual podría ser de gran utilidad en investigaciones sobre la repercusión de las sustituciones de aminoácidos en su actividad y espectro antimicrobiano y en los efectos sinérgicos entre bacteriocinas similares entre sí pero no idénticas.





# CAPÍTULO / CHAPTER 8

**Conclusiones**

---

**Conclusions**



**Primera.** La fusión del gen estructural de la sakacina A madura (*sapA*) y de su gen de inmunidad (*saiA*), ambos codificados por *Lb. sakei* Lb706, así como de dos de sus quimeras génicas derivadas de las regiones N-terminal de la enterocina P (*entP/sapA*) y de la enterocina A (*entA/sapA*) a diversos péptidos señal (PS), permitió su clonación en vectores de expresión con promotores constitutivos o inducibles y su transferencia por transformación a otras bacterias lácticas (BAL). La producción, actividad antimicrobiana y actividad antimicrobiana específica de la SakA y de sus quimeras producidas por las BAL recombinantes dependió del péptido señal, del vector de expresión, de la bacteriocina evaluada y de la BAL productora. Aunque la mayoría de cepas recombinantes derivadas de *L. lactis* NZ9000 y *Lb. sakei* Lb706 produjeron una mayor cantidad de SakA, EntP/SakA y EntA/SakA que el productor natural *Lb. sakei* Lb706, solamente *L. lactis* NZ9000 (pNUPS) y *Lb. sakei* Lb706 (pGUS) mostraron una mayor actividad antimicrobiana (6,4 veces mayor y 2,9 veces mayor) y una mayor actividad antimicrobiana específica (4,5 veces mayor y 1,3 veces mayor), respectivamente, que la SakA producida por *Lb. sakei* Lb706.

**Segunda.** La clonación del gen estructural de la sakacina A madura (*sapA*) y de su quimera génica *entP/sapA* en los vectores de expresión pPICZαA y pKLAC2, permitió la producción de SakA y EntP/SakA por levaduras recombinantes derivadas de *P. pastoris* X-33 y *K. lactis* GG799. La producción de SakA por *P. pastoris* X-33SA fue menor que la producción de EntP/SakA por *P. pastoris* X-33PSA, aunque la producción de SakA y EntP/SakA por dichas levaduras fue de 1,8 y 24,2 veces mayor, respectivamente, que la producción de SakA por *Lb. sakei* Lb706. Por otra parte, la producción de SakA por *K. lactis* GG799SA y de EntP/SakA por *K. lactis* GG799PSA fue de 11,4 veces mayor y de 55,2 veces mayor, respectivamente, que la producción de SakA por *Lb. sakei* Lb706. Sin embargo, la actividad antimicrobiana total y la actividad antimicrobiana específica de la SakA y EntP/SakA producidas por las levaduras recombinantes fueron o no detectables o mucho menores, que las deducidas de su producción.

**Tercera.** El diseño de genes sintéticos deducidos de la secuencia aminoacídica conocida de la enterocina A (EntA), producida por *E. faecium* T136 y de la bacteriocina E50-52 (BacE50-52), producida por *E. faecium* B-32746, con el codon de uso adaptado para su expresión por *P. pastoris* X-33 y *K. lactis* GG799 y su clonación en los vectores de expresión pPICZαA y pKLAC2, respectivamente, permitió la producción de bacteriocinas con actividad antimicrobiana. Es importante destacar que la producción de EntA por *P. pastoris*X33EAS fue 21,4 veces mayor, su actividad antimicrobiana 235 veces mayor y su actividad antimicrobiana específica 11 veces mayor que la EntA producida por *E. faecium*T136. Sin embargo, la producción de EntA por *K. lactis*GG799EAS fue 1,2 veces mayor aunque su actividad antimicrobiana y actividad antimicrobiana específicas fueron 2,5 veces 6,1 veces menores, respectivamente, que la EntA producida por *E. faecium* T136. Por el contrario, la BacE50-52 sólo mostró actividad antimicrobiana purificada de los sobrenadantes de *P. pastoris*X33 B5052S y *K. lactis* GG799B5052S, con actividad inhibidora frente a bacterias Gram-positivas pero no frente a Gram-negativas.

**Cuarta.** La sustitución de la secuencia líder de la enterocina A ( $LS_{EntA}$ ) por el péptido señal de la proteína Usp45 ( $PS_{usp45}$ ) y la clonación posterior del  $PS_{usp45}$  fusionado a la EntA madura con su gen de inmunidad ( $entA+entiA$ ) (UAI) en los vectores de expresión con promotores inducibles pSIP409 y pSIP411 o constitutivo pMG36c, permitió la construcción de los plásmidos derivados pSIP409UAI, pSIP411UAI y pMGUAI. La transformación de *Lb. sakei* Lb790, *Lb. plantarum* NC8 y *Lb. casei* CECT475 con los plásmidos citados, permitió la producción de EntA con actividad antimicrobiana. De interés es la mayor producción de EntA por *Lb. sakei* Lb790 (pSIP411UAI) y *Lb. casei* CECT475 (pSIP411UAI) comparada con la menor producción de EntA por otros *Lactobacillus* spp. y *E. faecium* T136. Es importante destacar la producción por *Lb. casei* CECT475 (pSIP411UAI) de una mayor cantidad de EntA (4,9 veces mayor) con una actividad antimicrobiana y una actividad antimicrobiana específica de 22,8 y 4,7 veces mayor, respectivamente, que la EntA producida por *E. faecium* T136.

**Quinta.** La cepa de *E. faecalis* DBH18 codifica los genes *ef1097*, *entL50A-entL50B* y dos genes más, similares a *entL50A-entL50B*, denominados *entJSA-entJSB*. Los genes *entL50A-entL50B* son idénticos en *E. faecalis* DBH18 y *E. faecium* L50 aunque parecen tener una localización genética diferente en ambos microorganismos. La secuenciación por técnicas de genética inversa de la región génica adyacente a *entJSA-entJSB* ha permitido identificar la presencia de doce hipotéticos marcos de lectura abiertos (ORFs). La secuencia y organización genética de los ORFs es similar, pero no idéntica, a genes adyacentes a *entL50A-entL50B* en *E. faecium* L50 y *E. faecium* 6T1a. La evaluación de la actividad antimicrobiana del producto de los genes *entJSA* y *entJSB*, obtenido mediante experiencias de transcripción-traducción *in vitro*, confirma que dichos genes son los responsables de la producción y actividad antimicrobiana de la enterocina JS (EntJSA y EntJSB).

**First.** The fusion of the structural gene encoding mature sakacin A (*sapA*) and its cognate immunity gene (*saiA*), both encoded by *Lb. sakei* Lb706, as well as those encoding chimeras from the N-terminal region from enterocin P (*entP/sapA*) and enterocin A (*entA/sapA*) to different signal peptides (SP), permitted their cloning in expression vectors with inducible or constitutive promoters and their transfer by transformation to other lactic acid bacteria (LAB). The production, antimicrobial activity and specific antimicrobial activity of the SakA and its chimeras produced by the recombinant LAB depended on the signal peptide, the expression vector, the evaluated bacteriocin and the producer LAB. Although most recombinant strains derived from *L. lactis* NZ9000 and *Lb. sakei* Lb706 produced a larger amount of SakA, SakA/EntP and EntA/SakA than the native producer *Lb. sakei* Lb706, only supernatants from *L. lactis* NZ9000 (pNUPS) and *Lb. sakei* Lb706 (pGUS) showed an increased antimicrobial activity (6.4 times higher and 2.9 times higher) and higher specific antimicrobial activity (4.5 times higher and 1.3 times higher), respectively, than the SakA produced by *Lb. sakei* Lb706.

**Second.** The cloning of the structural gene for mature sakacin A (*sapA*) and its chimera *entP/sapA* in the expression vectors pPICZ $\alpha$ A and pKLAC2, permitted the production of SakA and EntP/SakA by recombinant yeasts derived from *P. pastoris* X-33 and *K. lactis* GG799. The production of SakA by *P. pastoris* X-33SA was lower than production of EntP/SakA by *P. pastoris* X-33PSA, although the production of SakA and EntP/SakA by these yeasts was 1.8 and 24.2 times greater, respectively, than the SakA produced by *Lb. sakei* Lb706. On the other hand, the production of SakA by *K. lactis* GG799SA and the production of EntP/SakA by *K. lactis* GG799PSA was 11.4 times and 55.2 times greater, respectively, than production of SakA by *Lb. sakei* Lb706. However, the antimicrobial activity and the specific antimicrobial activity of the SakA and EntP/SakA produced by the recombinant yeasts were undetectable or much lower, than deduced from its production in the supernatants of the producer yeasts.

**Third.** The design of synthetic genes deduced from the known amino acid sequence of the enterocin A (EntA), produced by *E. faecium* T136 and the bacteriocin E50-52 (BacE50-52), produced by *E. faecium* B-32746 with the codon usage for their expression by *P. pastoris* X-33 and *K. lactis* GG799 and their cloning in the protein expression vectors pPICZ $\alpha$ A and pKLAC2, respectively, permitted the production of bacteriocins with antimicrobial activity. It is noteworthy to notice that the production of EntA by *P. pastoris* X33EAS was 21.4 times greater, its antimicrobial activity 235 times higher and its specific antimicrobial activity 11 times greater, than the EntA produced by *E. faecium* T136. However, the production of EntA by *K. lactis* GG799EAS was 1.2 times higher whereas its antimicrobial activity and specific antimicrobial activity were 2.5 times and 6.1 times lower, respectively, than the EntA produced by *E. faecium* T136. On the other hand, the BacE50-52 only showed antimicrobial activity when purified from the supernatants *P. pastoris* X33B5052S and *K. lactis* GG799B5052S with antagonistic activity against Gram-positive but not against Gram-negative bacteria.

**Fourth.** The replacement of the leader sequence of enterocin A ( $LS_{EntA}$ ) by the signal peptide from protein Usp45 ( $SP_{usp45}$ ) and the subsequent cloning of  $PS_{usp45}$  fused to mature EntA with its immunity gene ( $entA+entiA$ ) (UAI) in protein expression vectors with inducible pSIP409 and pSIP411 or constitutive pMG36c promoters, permitted construction of plasmids pSIP409UAI, pSIP411UAI and pMGUAI. The transfer of these plasmids by transformation into *Lb. sakei* Lb790, *Lb. plantarum* NC8 and *Lb. casei* CECT475 permitted the production by the host cells of EntA with antimicrobial activity. Of interest is the largest production of EntA by *Lb. sakei* Lb790 (pSIP411UAI) and *Lb. casei* CECT475 (pSIP411UAI) compared to the lower production of EntA by other *Lactobacillus spp.* and *E. faecium* T136. Is noteworthy to notice the large production (4.9 times greater) of EntA by *Lb. casei* CECT475 (pSIP411UAI) with an antimicrobial activity and a specific antimicrobial activity of 22.8 and 4.7 times higher, respectively, than the EntA produced by *E. faecium* T136.

**Fifth.** *E. faecalis* DBH18 encodes the bacteriocin-producing genes *ef1097* and *entL50A-entL50B* and the *entL50A-entL50B*-like genes, termed *entJSA* and *entJSB*. The genes *entL50A-entL50B* are identical in *E. faecium* L50 and *E. faecalis* DBH18 although they may have different genetic location in both microorganisms. Sequencing by reverse genetics of genes adjacent to *entJSA-entJSB* has identified the presence of twelve putative open reading frames (ORFs) including *entJSA-entJSB*. The nucleotide sequence and organization of the ORFs is similar but not identical to adjacent genes close to *entL50A-entL50B* in *E. faecium* L50 and *E. faecium* 6T1a. The evaluation of the antimicrobial activity of the product of genes *entJSA* and *entJSB* by an *in vitro* transcription-translation assay confirm that these genes are responsible of the production and antimicrobial activity of the bacteriocin enterocin JS (EntJSA and EntJSB).

## **Trabajo futuro**





Muchas bacteriocinas manifiestan una elevada actividad antimicrobiana y amplio espectro de acción y son más activas que los antibióticos convencionales frente a bacterias Gram-positivas mientras no manifiestan actividad antagonista ni toxicidad conocida frente a células u organismos eucariotas. Además, con la identificación de más géneros y especies bacterianas con resistencias a antibióticos el empleo de las bacteriocinas como alternativa o complemento a la utilización de los antibióticos ha cobrado un renovado interés ya que podrían evaluarse como péptidos antimicrobianos naturales con posibles aplicaciones en la industria alimentaria, en medicina humana y veterinaria y en producción animal. Por ello, en este trabajo se han evaluado la clonación, producción y expresión funcional de bacteriocinas procedentes tanto de organismos productores (genes amplificados por PCR) como por síntesis química (genes sintéticos) en hospedadores más seguros, que las produzcan en mayores cantidades o que proporcionen una mayor actividad antimicrobiana a otras bacterias lácticas (BAL) utilizadas o utilizables como cultivos iniciadores, protectores o probióticos. Para ello, se han evaluado dos modelos experimentales de producción heteróloga de bacteriocinas basados, esencialmente, en su producción por otras BAL y levaduras.

Respecto a la producción heteróloga de las bacteriocinas sakacina A (SakA) y dos de sus quimeras génicas (EntA/SakA y EntP/SakA) así como de la enterocina A (EntA) por otras BAL los resultados obtenidos sugieren que la producción, actividad antimicrobiana y actividad antimicrobiana específica de las bacteriocinas producidas del vector de expresión, del péptido señal (PS) encargado de dirigir su procesamiento, transporte y secreción a través de la ruta Sec-dependiente y de la BAL hospedadora. Los resultados derivados de la producción y expresión funcional de estas bacteriocinas por las BAL recombinantes deberían utilizarse como punto de partida para su producción en otras BAL mejor adaptadas para su desarrollo en diversos sustratos cárnicos, lácteos y vegetales así como para su posible empleo como probióticos en los piensos para animales. También debería evaluarse la producción y expresión funcional de estas bacteriocinas mediante el empleo de vectores de expresión con mayor número de copias, con promotores más activos o mediante su transferencia a otras BAL productoras de bacteriocinas con actividad antimicrobiana complementaria o determinada frente a bacterias patógenas de interés en la industria alimentaria, en medicina humana y veterinaria y en producción animal. También debería realizarse un mayor esfuerzo investigador para sustituir los marcadores de selección de los vectores de expresión con genes de resistencia a antibióticos por vectores de expresión de “grado alimentario”. Ya se conocen metodologías que permiten la selección positiva de bacterias transformadas mediante la complementación de fenotipos auxótrofos de alguna ruta metabólica o mediante uso de marcadores dominantes de selección, como los marcadores de resistencia a bacteriocinas o iones metálicos. También se dispone de vectores de “grado alimentario” para la integración de los genes de interés en el genoma de las BAL. También se debería profundizar más en la identificación y caracterización de otros péptidos señal (PS) homólogos o heterólogos para la cepa hospedadora y activos en diversas BAL que dirijan el procesamiento, transporte y secreción de bacteriocinas o de otros péptidos antimicrobianos biológicamente activos de manera más eficaz.

Respecto a la producción heteróloga de las bacteriocinas SakA, EntP/SakA, EntA y bacteriocina E 50-52 (BacE50-52) por *P. pastoris* y *K. lactis* las metodologías experimentales empleadas y los resultados obtenidos servirán como modelo para la clonación, producción y expresión funcional de otras bacteriocinas o péptidos bioactivos de interés en estas levaduras o en otras más. Además, conviene conocer que la EntA y la BacE50-52 son las primeras bacteriocinas derivadas de genes sintéticos y con el codon de uso apropiado para su producción por las levaduras *P. pastoris* y *K. lactis*. El éxito, derivado de este trabajo para producir bacteriocinas biológicamente activas partiendo de su secuencia aminoacídica conocida y con el codón de uso adaptado para su expresión por las levaduras citadas, podría permitir evaluar la producción de otras bacteriocinas y péptidos antimicrobianos cuando el acceso a la cepa productora no es factible o cuando se busca la optimización del proceso de producción heteróloga. Asimismo, el auge en las tecnologías de secuenciación genómica ha permitido la obtención y publicación de genomas completos donde identificar posibles bacteriocinas nuevas o péptidos antimicrobianos todavía no descritos. Aun cuando un microorganismo productor no fuera capaz de expresar una proteína o péptido antimicrobiano, la clonación y producción funcional de su gen sintético podría permitir la identificación de nuevos agentes antimicrobianos ahora desconocidos o solamente intuidos. Es importante destacar que las levaduras se desarrollan en medios de cultivo que facilitan una rápida producción de la bacteriocina de interés y de una elevada actividad antimicrobiana y actividad antimicrobiana específica, lo que las identifica como auténticas factorías celulares de producción de bacteriocinas. Las bacteriocinas producidas por levaduras y purificadas parcialmente o a homogeneidad podrían evaluarse como ingredientes alimentarios con actividad antimicrobiana, como componentes bioactivos de los envases alimentarios o como agentes antimicrobianos en medicina humana y veterinaria y en producción animal. No obstante, a pesar de los resultados obtenidos debería realizarse un mayor esfuerzo investigador para optimizar los mecanismos de producción y, sobre todo, de recuperación y purificación de las bacteriocinas producidas. La selección de levaduras productoras de bacteriocinas con un mayor número de copias del gen que codifica la bacteriocina de interés, el uso de promotores más activos inducibles por compuestos inocuos, el empleo de medios de cultivo más económicos y el escalado de la producción de bacteriocinas en fermentadores con un control estricto del pH, temperatura, aireación, velocidad de agitación u otras variables pueden incrementar notablemente, sin ninguna duda, la producción de bacteriocinas por las levaduras de interés.

El empleo de genes sintéticos también podría suponer un gran avance en la mejora de la producción heteróloga de bacteriocinas por otras BAL como los lactobacilos, un grupo de BAL que cada día adquieren una mayor notoriedad como cultivos iniciadores, protectores y probióticos. En este contexto, el diseño y construcción de vectores de expresión proteica con promotores sintéticos hiperactivos constitutivos o inducibles y diversos péptidos señal (PS) podrían permitir la producción por lactobacilos con otras actividades probióticas de bacteriocinas con elevada actividad antimicrobiana y espectro de acción.

Finalmente, también ha sido interesante determinar que *E. faecalis* DBH18 un enterococo con un potencial biotecnológico elevado, previamente aislado de ánades reales

(*Anas platythynchos*), codifica la bacteriocina Sec-dependiente enterococina V583 (EntV583) y las bacteriocinas sin secuencia líder ni péptido señal enterocina L50 (EntL50A y EntL50B) y enterocina JS (EntJSA y EntJSB), lo que sugiere que *E. faecalis* DBH18 codifica múltiples bacteriocinas cuya secuencia nucleotídica parece no limitarse a especies determinadas de enterococos ni al origen alimentario, clínico o ambiental de los enterococos que las codifican. También se ha logrado la secuenciación de los genes adyacentes a *entJSA-entJSB* lo que nos ha permitido conocer el conjunto de genes (operon) posiblemente involucrados pero, todavía sin demostración experimental, en la inmunidad, regulación, procesamiento, transporte y secreción de la bacteriocina EntJS (EntJSA y EntJSB). Por ello, de gran interés sería proceder a la secuenciación del genoma completo de *E. faecalis* DBH18 con el fin de identificar la presencia de plásmidos, transposones, otros elementos genéticos móviles o secuencias de inserción que permitan una mejor comprensión de los sistemas de transferencia genética involucrados en la presencia y dispersión de los genes que codifican bacteriocinas sin secuencia líder ni péptido señal en los enterococos. Asimismo, la determinación del genoma completo de *E. faecalis* DBH18 permitiría determinar no solo el posicionamiento de los genes *entL50-entL50B* respecto a los *entJSA-entJSB* en esta cepa sino, además, si los genes adyacentes a *entL50A-entL50B* son similares a los observados adyacentes a *entJSA-entJSB*. Dichas experiencias y sus posibles resultados también serán de gran interés científico y aplicado en microbiología de los alimentos, en salud pública y en el área de trabajo de las bacteriocinas.



**Resumen**

---

**Summary**



## INTRODUCCIÓN

La industria alimentaria es consciente de la demanda por los consumidores de alimentos de elevada calidad, seguridad y propiedades organolépticas y nutricionales deseables. El empleo por la industria alimentaria de aditivos y conservadores químicos con el objetivo de reducir, eliminar o controlar en los alimentos el desarrollo de microorganismos indeseados o de sus metabolitos tóxicos, así como para extender su vida útil no son siempre bien aceptados por la sociedad. En este contexto, la búsqueda e identificación de conservadores y otros aditivos naturales para su empleo en los alimentos podría no solamente reportar beneficios económicos sino mejorar su imagen social. Por ello, uno de los objetivos de la comunidad científica en el área de la calidad y seguridad alimentaria ha sido el de la identificación y caracterización de péptidos antimicrobianos naturales para el control de microorganismos que no sólo pudieran modificar las cualidades organolépticas de los alimentos, sino constituir un peligro para la salud de los consumidores. Y en este contexto, de especial interés científico y aplicado ha sido la identificación y caracterización de péptidos antimicrobianos producidos por bacterias, denominados bacteriocinas.

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal producidos por bacterias, con o sin modificaciones postraduccionales y secretadas al exterior por la ruta general de transporte (GTS) o sistema Sec-dependiente o mediante un sistema de transporte dedicado (DTS) por un transportador-ABC. No obstante, de algunas bacteriocinas como las sintetizadas sin secuencia líder o péptido señal todavía se desconoce con exactitud su procesamiento, transporte y secreción. Igualmente, algunas de las bacteriocinas más activas y de mayor espectro de acción están producidas por microorganismos que codifican potenciales factores de virulencia, lo que determina el desarrollo de metodologías que permitan su producción por otros microorganismos más seguros. Por ello, debido al elevado potencial biotecnológico de las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas (BAL) de gran interés científico y aplicado es el desarrollo de metodologías que permitan la producción de bacteriocinas por otras BAL o microorganismos más seguros, que las produzcan en mayores cantidades, que faciliten su purificación, que faciliten su empleo como ingredientes alimentarios con actividad antimicrobiana o que confieran la posibilidad de utilizar los microorganismos productores como cultivos iniciadores, protectores o probióticos de los alimentos. Los beneficios derivados del estudio, desarrollo y evaluación de estas tecnologías, permitirán en un futuro próximo la evaluación de las bacteriocinas y de los microorganismos productores de bacteriocinas para su utilización por la industria alimentaria y en aplicaciones médicas, farmacéuticas y veterinarias.

## OBJETIVOS

Por consiguiente, los objetivos de este trabajo de investigación han sido los siguientes:

**A).** Clonación, producción y expresión funcional de la sakacina A (SakA), producida por *Lb. sakei* Lb706y de dos quimeras de la SakA denominadas enterocina P/Sakacina A (EntP/SakA) y enterocina A/Sakacina A (EntA/SakA) por otras bacterias lácticas (BAL),



mediante el empleo de vectores de expresión proteica con promotores constitutivos o inducibles.

**B).** Purificación a homogeneidad de la SakA producida por *L. lactis* subesp. *cremoris* NZ9000 (pNUS), de la quimera EntP/SakA producida por *L. lactis* subesp. *cremoris* NZ9000 (pNUPS), de la quimera EntA/SakA producida por *L. lactis* subesp. *cremoris* NZ9000 (pNUAS) y de la SakA producida por la cepa control de *Lb. sakei* Lb706 y determinación de su tamaño molecular mediante espectometría de masas (MALDI-TOF MS).

**C).** Determinación de la actividad antimicrobiana de las cepas recombinantes derivadas de *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 y *Lb. sakei* Lb706 frente a *Listeria* spp. incluyendo *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. innocua* y cinco cepas diferentes de *L. monocytogenes*.

**D).** Clonación, producción y expresión funcional de la SakA producida por *Lb. sakei* Lb706 y de una de sus quimeras génicas (EntP/SakA) por levaduras recombinantes derivadas de *P. pastoris* X-33 y *K. lactis* GG799, utilizando vectores de expresión proteica con promotores inducibles.

**E).** Clonación, producción y expresión funcional de las bacteriocinas E50-52 (BacE50-52), con actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas Gram negativas y de la enterocina A (EntA) activa frente a bacterias patógenas Gram positivas de interés en la industria alimentaria, mediante la clonación de genes sintéticos deducidos de su secuencia aminoacídica en vectores de expresión con promotores inducibles y de su producción por levaduras recombinantes derivadas de *P. pastoris* X-33 y *K. lactis* GG799.

**F).** Clonación, producción y expresión funcional de la enterocina A (EntA) producida por *E. faecium* T136 y de elevada actividad antilisteriana por bacterias lácticas (BAL) del género *Lactobacillus* utilizando los vectores de expresión pSIP409, pSIP411 y pMG36c con promotores constitutivos e inducibles.

**G).** Determinación de la actividad antimicrobiana de cepas recombinantes derivadas de *Lb. sakei* Lb790, *Lb. plantarum* NC8 y *Lb. casei* CECT475 frente a *Listeria* spp. incluyendo *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. innocua* y cinco cepas diferentes de *L. monocytogenes*.

**H).** Determinación en *E. faecalis* DBH18, un enterococo con potenciales aplicaciones biotecnológicas de la presencia de genes que codifican bacteriocinas y de la secuencia de genes que codifican la enterocina JS (*entJSA* y *entJSB*) y genes adyacentes.

## RESULTADOS

Con la finalidad de lograr los objetivos propuestos se ha desarrollado el trabajo investigador que ha dado lugar a los resultados que se detallan a continuación.

**A). Clonación, producción y expresión funcional de la bacteriocina Sakacina A (SakA) y de dos quimeras de la SakA por bacterias lácticas (BAL) y las levaduras *Pichia pastoris* y *Kluyveromyces lactis*.** En la primera parte de este trabajo se procedió a la fusión de la sakacina A madura (SakA, codificada por *sapA*) y de su proteína conocida de inmunidad (SakI, codificada por *sapiA*) así como de dos quimeras génicas de la SakA, que reproducen la secuencia N-terminal de la enterocina A madura (EntA/SakA) y de la enterocina P madura (EntP/SakA), a diversos péptidos señal (PS). Igualmente, la clonación de las fusiones génicas previamente descritas en vectores de expresión proteica con promotores constitutivos (pMG36c) o inducibles (pNZ8048) y su posterior transferencia por transformación a diversas BAL, permitió evaluar la producción y expresión funcional de la SakA y de dos de sus quimeras por cepas recombinantes de *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 y *Lb. sakei* Lb706. Más aún, la clonación de los genes que codifican la SakA madura y la EntP/SakA en diversos vectores de expresión proteica han permitido, también, la evaluación de su producción y expresión funcional por las levaduras *P. pastoris* X-33 y *K. lactis* GG799. La producción, actividad antimicrobiana y actividad antimicrobiana específica de la SakA y de sus quimeras producidas por *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 dependió del péptido señal (PS) y del vector de expresión utilizados. No obstante, solamente *L. lactis* NZ9000 (pNUPS), productor de EntP/SakA, mostró una mayor producción de bacteriocina y mayor actividad antimicrobiana en sus sobrenadantes que *Lb. sakei* Lb706, productor natural de SakA. La menor actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de *L. lactis* NZ9000 (pNUS), productor de SakA, y de *L. lactis* NZ9000 (pNUAS), productor de EntA/SakA, se debió a la secreción de bacteriocinas truncadas. Por otra parte, de los cultivos de *Lb. sakei* Lb706 transformados con los vectores derivados de pMG36c solamente *Lb. sakei* Lb706 (pGUS), sobreproductor de SakA, mostró una mayor actividad antimicrobiana en sus sobrenadantes que *Lb. sakei* Lb706, el productor natural de SakA. Finalmente, la clonación de SakA y EntP/SakA en los vectores de expresión pPICZαA y pKLAC2, respectivamente, permitió la producción de SakA y EntP/SakA por cepas recombinantes derivadas de *P. pastoris* X-33 y *K. lactis* GG799, aunque su actividad antimicrobiana fué mucho menor de la deducida de su producción en los sobrenadantes de las levaduras productoras.

**(B). Utilización de genes sintéticos para la clonación, producción y expresión funcional de las bacteriocinas enterocina A (EntA) y bacteriocina E 50-52 (BacE50-52) por *Pichia pastoris* y *Kluyveromyces lactis*.** Otro de los objetivos de este trabajo consistió en el diseño de genes sintéticos, deducidos de la secuencia aminoacídica conocida de la bacteriocina enterocina A (EntA), producida por *E. faecium* T136 y de la bacteriocina E50-52 (BacE50-52), producida por *E. faecium* NRRL B-30746, con el codon de uso adaptado a la producción de proteínas y péptidos por las levaduras *P. pastoris* y *K. lactis*. Los genes sintéticos *entA* y *bacE50-52* se clonaron, posteriormente, en los vectores de expresión proteica pPICZαA y pKLAC2 y los vectores resultantes linearizados se integraron por transformación en células competentes de *P. pastoris* X-33 y *K. lactis* G799, respectivamente, lo que permitió la selección de *P. pastoris* X-33EAS (*entA*), *P. pastoris* X-33BE50-52S (*bacE50-52*), *K. lactis* GG799EAS (*entA*) y *K. lactis* GG799BE50-52S (*bacE50-52*). Los aislados de *P. pastoris* X-33EAS y *K. lactis* GG799EAS pero no los de *P. pastoris* X-33BE50-52S y *K. lactis*

GG799BE50-52S mostraron actividad antimicrobiana en sus sobrenadantes. Los resultados obtenidos demostraron que la cepa de *P. pastoris* X-33EA incrementó significativamente la producción, actividad antimicrobiana y actividad antimicrobiana específica de la EntA, en ausencia de proteínas dedicadas de secreción y de inmunidad. No obstante, este resultado contrasta con la menor producción y actividad antimicrobiana de la EntA producida por *K. lactis* GG799EAS y con la escasa actividad antimicrobiana de la BacE50-52 producida por *P. pastoris* X-33BE50-52S y *K. lactis* G799BE50-52S. La purificación de los sobrenadantes de las levaduras productoras permitió la recuperación y purificación a homogeneidad de las bacteriocinas EntA y BacE50-52. Todas las bacteriocinas purificadas mostraron actividad antimicrobiana frente a las bacterias Gram-positivas evaluadas incluyendo *L. monocytogenes* pero no frente a diversas bacterias Gram-negativas, incluyendo *Campylobacter jejuni*.

**(C). Sustitución de la secuencia líder y evaluación de diversos vectores para la producción heteróloga de la bacteriocina enterocina A (EntA) por *Lactobacillus sakei* Lb790, *Lactobacillus plantarum* NC8 y *Lactobacillus casei* CECT475.** Como tercer objetivo de este trabajo se procedió a la sustitución de la secuencia líder de la bacteriocina enterocina A (SL<sub>entA</sub>) por el péptido señal de la proteína Usp45 (PS<sub>usp45</sub>) producida por *L. lactis* subsp. *lactis*, así como a la clonación de fusiones génicas del PS<sub>usp45</sub> con la EntA madura más su gen de inmunidad (*entA* + *entiA*) (fragmento UAI) en los vectores de expresión proteica pSIP409 and pSIP411, bajo el control de promotores inducibles y en el vector pMG36c, con un promotor constitutivo, originando los vectores recombinantes pSIP409UAI, pSIP411UAI y pMGUAI, respectivamente. Asimismo, de los resultados de este trabajo se deduce que la producción, actividad antimicrobiana (AA) y actividad antimicrobiana específica (AAE) de la EntA producida por *Lb. sakei* Lb790, *Lb. plantarum* NC8 y *Lb. casei* CECT475 transformados con los vectores pSIP409UAI, pSIP411UAI y pMGUAI fué diferente, dependiendo del vector de expresión y de la cepa productora. Los sobrenadantes de *Lb. sakei* Lb709 (pSIP411UAI) mostraron 2,7 veces mayor producción de EntA, con una AA de 2,2 veces mayor y una AAE de 1,2 veces menor que los sobrenadantes del microorganismo control *E. faecium* T136. Sin embargo, los sobrenadantes de *Lb. casei* CECT (pSIP411UAI) mostraron 4,9 veces mayor producción de EntA, con una AA 22,8 veces mayor y una AAE 4,7 veces mayor que los sobrenadantes de *E. faecium* T136. Igualmente, los sobrenadantes de *Lb. sakei* Lb790 (pSIP411UAI) mostraron una actividad antimicrobiana de 3,8 veces menor a 2,7 veces mayor frente a diversas especies de *Listeria* incluyendo *L. monocytogenes* mientras que los sobrenadantes de *Lb. casei* CECT475 (pSIP411UAI) mostraron una actividad antimicrobiana de 15,7 a 59,2 veces mayor frente a *Listeria* spp. que la de *E. faecium* T136, productor natural de la EntA. Por ello, *Lb. casei* CECT457 (pSIP411UAI) sobreproductor de EntA con elevada actividad antimicrobiana (AA) y elevada actividad antimicrobiana específica (AAE) debería considerarse como un lactobacilo eficaz como cultivo iniciador y con un elevado potencial biotecnológico para la producción y expresión funcional de la bacteriocina EntA, de elevada actividad antilisteriana y potencial probiótico.

**(D). *Enterococcus faecalis* DBH18, un enterococo con potenciales aplicaciones biotecnológicas codifica los genes productores de bacteriocinas *ef1097*, *entL50A*-**

**entL50B y genes similares a entL50A-entL50B, denominados entJSA y entJSB.** Como último objetivo de este trabajo investigador se ha demostrado que *E. faecalis* DBH18, un enterococo aislado de ánades reales (*Anas platyrhynchos*) codifica los genes productores de bacteriocinas *ef1097*, *entL50A-entL50B* y genes similares a *entL50A-entL50B*, denominados *entJSA* y *entJSB*. Para ello, el ADN genómico purificado de *E. faecalis* DBH18 se amplificó por PCR con cebadores derivados del gen *ef1097*, que codifica la enterococcina V583 (EntV583) producida por *E. faecalis* V583 y con cebadores derivados de los genes *entL50A-entL50B* que codifican la enterocina L50 (EntL50A y EntL50B) producida por *E. faecium* L50. La secuenciación de los fragmentos génicos obtenidos confirmó la presencia en *E. faecalis* DBH18 de los genes evaluados así como de un gen similar a *entL50B*, denominado *entJSB*. No obstante, mientras que la secuencia de los genes *entL50A-entL50B* son idénticas en *E. faecium* L50 y *E. faecalis* DBH18 los resultados obtenidos por una PCR anidada sugieren que dichos genes pueden encontrarse en una localización diferente en ambos microorganismos. Finalmente, la secuenciación por técnicas de genética inversa de genes adyacentes a *entJSB* de *E. faecalis* DBH18 reveló la existencia de doce marcos de lectura abiertos (ORF) incluyendo los genes *entL50A-entL50B*. Experiencias realizadas para determinar la actividad antimicrobiana de los productos de los genes *entL50B*, *entL50B*, *entJSA* y *entJSB* obtenidos por técnicas de transcripción/traducción *in vitro* demostraron que: (i) *entJSA* y *entJSB* son necesarios para la producción y expresión funcional de la enterocina JS (EntJSA y EntJSB), (ii) EntL50A y EntL50B manifiestan una mayor actividad antimicrobiana que EntJSA y EntJSB y, (iii) la actividad antimicrobiana de EntL50A, EntL50B, EntJSA y EntJSB dependen de la actividad antimicrobiana y sinergismo de cada uno de los productos individuales. Por último, el análisis de las bacteriocinas purificadas de los sobrenadantes de *E. faecalis* DBH18 por espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) sugieren la presencia de una metionina formilada en la región N-terminal de la secuencia aminoacídica de la EntJSA y EntJSB.

## CONCLUSIONES

**Primera.** La fusión del gen estructural de la sakacina A madura (*sapA*) y de su gen de inmunidad (*saiA*), ambos codificados por *Lb. sakei* Lb706, así como de dos de sus quimeras génicas derivadas de las regiones N-terminal de la enterocina P (*entP/sapA*) y de la enterocina A (*entA/sapA*) a diversos péptidos señal (PS), permitió su clonación en vectores de expresión con promotores constitutivos o inducibles y su transferencia por transformación a otras bacterias lácticas (BAL). La producción, actividad antimicrobiana y actividad antimicrobiana específica de la SakA y de sus quimeras producidas por las BAL recombinantes dependió del péptido señal, del vector de expresión, de la bacteriocina evaluada y de la BAL productora. Aunque la mayoría de cepas recombinantes derivadas de *L. lactis* NZ9000 y *Lb. sakei* Lb706 produjeron una mayor cantidad de SakA, EntP/SakA y EntA/SakA que el productor natural *Lb. sakei* Lb706, solamente *L. lactis* NZ9000 (pNUPS) y *Lb. sakei* Lb706 (pGUS) mostraron una mayor actividad antimicrobiana (6,4 veces mayor y 2,9 veces mayor) y una mayor actividad antimicrobiana específica (4,5 veces mayor y 1,3 veces mayor), respectivamente, que la SakA producida por *Lb. sakei* Lb706.

**Segunda.** La clonación del gen estructural de la sakacina A madura (*sapA*) y de su quimera génica *entP/sapA* en los vectores de expresión pPICZαA y pKLAC2, permitió la producción de SakA y EntP/SakA por levaduras recombinantes derivadas de *P. pastoris* X-33 y *K. lactis* GG799. La producción de SakA por *P. pastoris* X-33SA fue menor que la producción de EntP/SakA por *P. pastoris* X-33PSA, aunque la producción de SakA y EntP/SakA por dichas levaduras fue de 1,8 y 24,2 veces mayor, respectivamente, que la producción de SakA por *Lb. sakei* Lb706. Por otra parte, la producción de SakA por *K. lactis* GG799SA y de EntP/SakA por *K. lactis* GG799PSA fue de 11,4 veces mayor y de 55,2 veces mayor, respectivamente, que la producción de SakA por *Lb. sakei* Lb706. Sin embargo, la actividad antimicrobiana total y la actividad antimicrobiana específica de la SakA y EntP/SakA producidas por las levaduras recombinantes fueron o no detectables o mucho menores, que las deducidas de su producción.

**Tercera.** El diseño de genes sintéticos deducidos de la secuencia aminoacídica conocida de la enterocina A (EntA), producida por *E. faecium* T136 y de la bacteriocina E50-52 (BacE50-52), producida por *E. faecium* B-32746, con el codon de uso adaptado para su expresión por *P. pastoris* X-33 y *K. lactis* GG799 y su clonación en los vectores de expresión pPICZαA y pKLAC2, respectivamente, permitió la producción de bacteriocinas con actividad antimicrobiana. Es importante destacar que la producción de EntA por *P. pastoris*X33EAS fue 21,4 veces mayor, su actividad antimicrobiana 235 veces mayor y su actividad antimicrobiana específica 11 veces mayor que la EntA producida por *E. faecium*T136. Sin embargo, la producción de EntA por *K. lactis*GG799EAS fue 1,2 veces mayor aunque su actividad antimicrobiana y actividad antimicrobiana específicas fueron 2,5 veces 6,1 veces menores, respectivamente, que la EntA producida por *E. faecium* T136. Por el contrario, la BacE50-52 sólo mostró actividad antimicrobiana purificada de los sobrenadantes de *P. pastoris*X33 B5052S y *K. lactis* GG799B5052S, con actividad inhibidora frente a bacterias Gram-positivas pero no frente a Gram-negativas.

**Cuarta.** La sustitución de la secuencia líder de la enterocina A ( $LS_{EntA}$ ) por el péptido señal de la proteína Usp45 ( $PS_{usp45}$ ) y la clonación posterior del  $PS_{usp45}$  fusionado a la EntA madura con su gen de inmunidad (*entA+ entIA*) (UAI) en los vectores de expresión con promotores inducibles pSIP409 y pSIP411 o constitutivo pMG36c, permitió la construcción de los plásmidos derivados pSIP409UAI, pSIP411UAI y pMGUAI. La transformación de *Lb. sakei* Lb790, *Lb. plantarum* NC8 y *Lb. casei* CECT475 con los plásmidos citados, permitió la producción de EntA con actividad antimicrobiana. De interés es la mayor producción de EntA por *Lb. sakei* Lb790 (pSIP411UAI) y *Lb. casei* CECT475 (pSIP411UAI) comparada con la menor producción de EntA por otros *Lactobacillus* spp. y *E. faecium* T136. Es importante destacar la producción por *Lb. casei* CECT475 (pSIP411UAI) de una mayor cantidad de EntA (4,9 veces mayor) con una actividad antimicrobiana y una actividad antimicrobiana específica de 22,8 y 4,7 veces mayor, respectivamente, que la EntA producida por *E. faecium* T136.

**Quinta.** La cepa de *E. faecalis* DBH18 codifica los genes *efl1097*, *entL50A-entL50B* y dos genes más, similares a *entL50A-entL50B*, denominados *entJSA-entJSB*. Los genes *entL50A-*

*entL50B* son idénticos en *E. faecalis* DBH18 y *E. faecium* L50 aunque parecen tener una localización genética diferente en ambos microorganismos. La secuenciación por técnicas de genética inversa de la región génica adyacente a *entJSA-entJSB* ha permitido identificar la presencia de doce hipotéticos marcos de lectura abiertos (ORFs). La secuencia y organización genética de los ORFs es similar, pero no idéntica, a genes adyacentes a *entL50A-entL50B* en *E. faecium* L50 y *E. faecium* 6T1a. La evaluación de la actividad antimicrobiana del producto de los genes *entJSA* y *entJSB*, obtenido mediante experiencias de transcripción-traducción *in vitro*, confirma que dichos genes son los responsables de la producción y actividad antimicrobiana de la enterocina JS (EntJSA y EntJSB).

## BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H. y Schwab, H. (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98:5301-5317.
- Axelsson., L. y Holck, A. (1995). The genes involved in production of and immunity to sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J. Bacteriol.* 177:2125-2137.
- Aymerich, T., Holo, H., Håvarstein, L.S., Hugas, M., Garriga, M. y Nes, I.F. (1996). Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin-family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1676-1682.
- Borrero, J., Jiménez, J.J., Gútiez, L., Herranz, C., Cintas, L.M. y Hernández, P.E. (2011a). Use of the *usp45* lactococcal secretion sequence signal sequence to drive the secretion and functional expression of enterococcal bacteriocins in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89:131-143.
- Borrero, J., Kunze, G., Jiménez, J.J., Böer, E., Gútiez, L., Herranz, C., Cintas, L.M. y Hernández, P.E. (2012). Cloning, production and functional expression of the bacteriocin enterocin A, produced by *Enterococcus faecium* T136, by the yeasts *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha* and *Arxula adenivorans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:5956-5961.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Herranz, C., Håvarstein, L.S., Holo, H., Hernández, P.E. y Nes, I.F. (2000). Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.* 182:6806-6814.
- Denis-Quanquin, S., Lamouroux, L., Lougarre, A., Mahéo, S., Saves, I., Paquereau, L., Demange, P. y Fournier, D. (2007). Protein expression from synthetic genes: selection of clones using GFP. *J. Biotechnol.* 131:223-230.
- De Vuyst, L. y Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13(4):194-9.
- Drider, D., Fimland, G., Héchar, Y., McMullen, L.M. y Prévost, H. (2006). The continuing story of class Iia bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70:564-582.
- Gasser, B., Saloheimo, M., Rinas, U., Dragosits, M., Rodríguez-Carmona, E., Baumann, K., Giuliani, M., Parrilli, E., Branduardi, P., Lang, C., Porro, D., Ferrer, P., Tutino, M.L.,

- Mattanovich, D. y Villaverde, A. (2008). Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview. *Microb. Cell. Fact.* 4:7-11.
- Han, J.H., Choi, Y.S., Kim, W.J., Jeon, Y.H., Lee, S.K., Lee, B.J. y Ryu, K.S. (2010). Codon optimization enhances protein expression of human peptide deformylase in *E. coli*. *Prot. Expr. Purif.* 70:224-230.
- Holo, H. y Nes, I.F. (1989). High-frequency transformation by electroporation of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:3119-3123.
- Karlskås, I.L., Maudal, K., Axelsson, L., Rud, I., Eijsink, V.G.H. y Mathiesen, G. (2014). Heterologous protein secretion in lactobacilli with modified pSIP vectors. *PLoS ONE*. 9(3):e91125.
- Kjos, M., Borrero, J., Opsata, M., Birri, D.J., Holo, H., Cintas, L.M., Snipen, L., Hernández, P.E., Nes, I.F. y Diep, D.B. (2011). Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Microbiology* 157:3256-3267.
- Mathiesen, G., Sveen, A., Piard, J.C., Axelsson, L. y Eijsink, V.G.H. (2008). Heterologous protein secretion by *Lactobacillus plantarum* using homologous signal peptides. *J. Appl. Microbiol.* 105:215-226.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Håvarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V. y Holo, H. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antoine van Leeuwenhoek*. 70:113-128.
- Sørvig, E., Mathiesen, G., Naterstad, K., Eijsink, V.G.H. y Axelsson, L. (2005). High-level, inducible gene expression in *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus plantarum* using versatile expression vectors. *Microbiology* 151:2439-2449.
- Svetoch, E.A. y Stern, N.J. (2010). Bacteriocins to control *Campylobacter spp.* in poultry -a review. *Poult. Sci.* 89:1763-1768.

## INTRODUCTION

The food industry is aware of the demand by consumers of food of high quality, safety and desirable organoleptic and nutritional properties. Accordingly, the use of chemical preservatives to reduce, eliminate or control the development of unwanted microorganisms or toxic metabolites in food, as well as to extend their shelf life is not always well accepted by the consumers. In this context, the search and identification of natural preservatives for use in foods could not only bring economic benefits to the food industry but also to improve its image. Therefore, one of the main objectives of researchers working in the fields of food science and technology and mainly, in food microbiology, has been the identification and characterization of natural antimicrobial peptides to control the growth of microorganisms that could not only modify the organoleptic characteristics of foods, but also constitute a hazard for the health of consumers. And in this context, of great scientific and applied interest has been the identification and characterization of natural antimicrobial peptides produced by bacteria, known as bacteriocins.

Bacteriocins are ribosomally synthesized antimicrobial peptides produced by bacteria, with or without post-translational modifications and secreted out of the cells by the general transport system (GTS) or Sec-dependent system or through a dedicated transport system (DTS) by an ABC-transporter. However, for those bacteriocins synthesized without a leader sequence or signal peptide the exact mechanism of processing, transport and secretion is still unknown. Besides, some of the most active bacteriocins with the broadest spectra of antimicrobial activity are produced by bacteria that encode potential virulence factors, leading to the development of methodologies that could permit their production by safer microorganisms. Furthermore, due to the high biotechnological potential of bacteriocins produced by lactic acid bacteria (LAB) of great scientific and applied interest is the development of methodologies that could permit the production of bacteriocins by other BAL or safer microorganisms that could produce the bacteriocins in larger quantities, that facilitate their purification, their use as natural food ingredients with antimicrobial activity or that confer to the producing microorganisms their further evaluation as starters or protective cultures and as probiotics. The benefits derived from the study, development, and evaluation of these technologies may permit further evaluation of the bacteriocins and/or the bacteriocinogenic producers for their usefulness as natural antimicrobial agents in the food industry and in pharmaceutical, medical and veterinary applications.

## OBJECTIVES

Accordingly, the objectives of this research work have been the following:

**A).** Cloning, production and functional expression of the sakacin A (SakA), produced by *Lb. sakei* Lb706 and two of its SakA-derived chimeras termed enterocin P/Sakacin A (EntP/SakA) and enterocin A/Sakacin A (EntA/SakA) by other lactic acid bacteria (BAL) through the use of constitutive or inducible expression vectors.



**B).** Purification to homogeneity of the SakA produced by *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 (pNUS), the EntP/SakA produced by *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 (pNUPS), the EntA/SakA produced by *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 (pNUAS) and the SakA produced by the control strain *Lb. sakei* Lb706 and determination of their molecular mass by mass spectrometry analysis (MS-MALDI-TOF).

**C).** Determination of the antimicrobial activity of recombinant strains derived from *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 and *Lb. sakei* Lb706 against *Listeria* spp. including *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. innocua* and five different *L. monocytogenes* strains.

**D).** Cloning, production and functional expression of SakA, produced by *Lb. sakei* Lb706, and one of its genetically-derived chimeras (EntP/SakA) by recombinant yeasts derived from *P. pastoris* X-33 and *K. lactis* GG799 using expression vectors with inducible promoters.

**E).** Cloning, production and functional expression of the bacteriocin E50-52 (BacE50-52) with antimicrobial activity against Gram-negative strains and of enterocin A (EntA) active against Gram-positive strains, through the cloning of synthetic genes deduced from their amino acid sequence in expression vectors with inducible promoters, and their production by recombinant yeasts derived from *P. pastoris* X-33 and *K. lactis* GG799.

**F).** Cloning, production and functional expression of enterocin A (EntA) of high antilisterial activity and produced by *E. faecium* T136 by lactic acid bacteria (LAB) from the genus *Lactobacillus* using the expression vectors pSIP409, pSIP411 and pMG36c with constitutive or inducible promoters.

**G).** Evaluation of the antimicrobial activity of recombinant strains derived from *Lb. sakei* Lb790, *Lb. plantarum* NC8 and *Lb. casei* CECT475 against *Listeria* spp. including *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. innocua* and five different *L. monocytogenes* strains.

**H).** Determination in *E. faecalis* DBH18, an strain with potential biotechnological applications, the presence of genes encoding bacteriocins and genes encoding the enterocin JS (EntJSA and EntJSB) and adjacent genes.

## RESULTS

To achieve the proposed objectives the following experimental work has been performed, with the results detailed below.

**A). Cloning, production and functional expression of the bacteriocin sakacin A (SakA) and two SakA-derived chimeras by lactic acid bacteria (LAB) and the yeasts *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis*.** In the first part of this work, genes encoding mature sakacin A (SakA, encoded by *sapA*) and its cognate immunity protein (SakI, encoded by *sapiA*) as well as two SakA-derived chimeras, which reproduce the N-terminal sequence of mature enterocin A (EntA/SakA) and mature enterocin P (EntP/SakA), were genetically

fused to different signal peptides (SP). Furthermore, cloning of the fusions previously described into expression vectors with constitutive (pMG36c) or inducible (pNZ8048) promoters, and its subsequent transfer by transformation to different BAL, permitted evaluation of the production and functional expression of SakA and two of their derived chimeras by recombinant *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 and *Lb. sakei* Lb706 derivatives. Moreover, cloning of the genes encoding mature SakA and mature EntP/SakA in different expression vectors have also permitted determination of its production and functional expression by recombinant derivatives of the yeasts *Pichia pastoris* X-33 and *Kluyveromyces lactis* GG799. The production, antimicrobial activity and specific antimicrobial activity of the SakA and its chimeras produced by derivatives of *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 depended of the signal peptide (SP) and the expression vector. However, only *L. lactis* NZ9000 (pNUPS) producer of EntP/SakA showed in their supernatants a larger bacteriocin production and higher antimicrobial activity than *Lb. sakei* Lb706, a native SakA producer. The lower antimicrobial activity of *L. lactis* NZ9000 (pNUS), producer of SakA and of *L. lactis* NZ9000 (pNUAS), producer of EntA/SakA was due to secretion of truncated bacteriocins. On the other hand, from the *Lb. sakei* Lb706 cultures transformed with the pMG36c-derived vectors only *Lb. sakei* Lb706 (pGUS), overproducer of SakA showed higher antimicrobial activity than *Lb. sakei* Lb706, the native SakA producer. Finally, cloning of *sakA* and *entP/sakA* in the expression vectors pPICZαA and pKLAC2 permitted the production of SakA and EntP/SakA by recombinant strains derived from *P. pastoris* X-33 and *K. lactis* GG799, although their antimicrobial activity was much lower than deduced from their production in the supernatants of the producing yeasts.

**(B). Use of synthetic genes for cloning, production, and functional expression of the bacteriocin enterocin A (EntA) and bacteriocin E 50-52 (BacE50-52) by *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis*.** Other objective of this work was the design of synthetic genes, deduced from the known amino acid sequence of the bacteriocin enterocin A(EntA) produced by *E. faecium* T136 and the bacteriocin E50-52 (BacE50-52), produced by *E. faecium* NRRL B-30746, with their codon usage adapted to production of peptides and proteins by the yeasts *P. pastoris* and *K. lactis*. The synthetic genes, encoding EntA and BacE50-52 were cloned in the pPICZαA and pKLAC2 expression vectors and the resulting linearized vectors integrated by transformation into competent cells of *P. pastoris* X-33 and *K. lactis* GG799, respectively, which permitted selection of the recombinant *P. pastoris* X-33EAS (*entA*), *P. pastoris* X33BE50-52S (*bacE50-52*), *K. lactis* GG799EAS (*entA*) and *K. lactis* GG799BE50-52S (*bacE50-52*) strains. However, only *P. pastoris* X-33EAS and *K. lactis* GG799EAS but not *P. pastoris* X-33BE50-52S and *K. lactis* GG799BE50-52S showed antimicrobial activity in their supernatants. The results obtained showed that *P. pastoris* X-33EAS produces a significant amount of EntA of high antimicrobial activity and specific antimicrobial activity in the absence of dedicated proteins for secretion and immunity. However, this result contrasts with the lower production and antimicrobial activity of the EntA produced *K. lactis* GG799EAS and with the weak antimicrobial activity of the BacE50-52, produced by *P. pastoris* X-33BE50-52S and *K. lactis* G799BE50-52S. The purification of bacteriocins from supernatants of the producing yeasts enabled the recovery and purification to homogeneity of the bacteriocins EntA and BacE50-52. All purified bacteriocins showed antimicrobial activity

against all Gram-positive bacteria evaluated including *L. monocytogenes* but not against the Gram-negative bacteria tested including *Campylobacter jejuni*.

**(C). Replacement of the leader sequence and evaluation of different vectors for heterologous production of the bacteriocin enterocin A (EntA) by *Lactobacillus sakei* Lb790, *Lactobacillus plantarum* NC8 and *Lactobacillus casei* CECT475.** The third objective of this work consisted in replacement of the leader sequence of the bacteriocin enterocin A (LS<sub>entA</sub>) by the signal peptide of the protein Usp45 (SP<sub>usp45</sub>) produced by *L. lactis* subsp. *lactis*, as well as in cloning of the fused SP<sub>usp45</sub> with the mature EntA and its cognate immunity gene (*entA* + *entiA*) (fragment UAI) into the expression vectors pSIP409 and pSIP411, under control of inducible promoters and in vector pMG36c with a constitutive promoter, creating the recombinant vectors pSIP409UAI, pSIP411UAI and pMGUAI, respectively. Likewise, from the results obtained in this work we determined that the production, antimicrobial activity (AA) and specific antimicrobial activity (SAA) of the EntA produced by *Lb. sakei* Lb790, *Lb. plantarum* NC8 and *Lb. casei* CECT475 transformed with pSIP409UAI, pSIP411UAI and pMGUAI varied depending on the expression vector and the host strain. Supernatants from *Lb. sakei* Lb790 (pSIP411UAI) showed 2.7 times greater production of EntA, with a 2.2 times greater AA and 1.2 times lower SAA than supernatants from *E. faecium* T136. However, supernatants from *Lb. casei* CECT (pSIP411UAI) showed 4.9 times greater production of EntA, with a 22.8 times greater AA and 4.7 times higher SAA than supernatants from *E. faecium* T136. Similarly, supernatants from *Lb. sakei* Lb790 (pSIP411UAI) showed an antimicrobial activity from 3.8 times lower to 2.7 times higher against several *Listeria* spp. including *L. monocytogenes* while supernatants from *Lb. casei* CECT475 (pSIP411UAI) showed a 15.7 to 59.2 times higher antimicrobial activity against *Listeria* spp. than supernatants from *E. faecium* T136, natural producer of EntA. Accordingly, *Lb. casei* CECT475 (pSIP411UAI) overproducer of EntA with high antimicrobial activity (AA) and high specific antimicrobial activity (SAA) should be considered as an efficient *Lactobacillus* starter culture and with high biotechnological potential for production and functional expression of the bacteriocin EntA with high antilisterial activity and probiotic potential.

**(D). *Enterococcus faecalis* DBH18, an enterococcal strain with potential biotechnological applications encodes the bacteriocin-producing genes *ef1097* and *entL50A-entL50B* and the *entL50A-entL50B*-like genes, termed *entJSA* and *entJSB*.** The last accomplishment of this work was the determination that *E. faecalis* DBH18, previously isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*) encodes the bacteriocin-producing genes *ef1097*, *entL50A-entL50B* and the *entL50A-entL50B*-like genes, termed *entJSA* and *entJSB*. For this purpose, purified genomic DNA from *E. faecalis* DBH18 was amplified by PCR with primers deduced from *ef1097*, which encodes the enterococcin V583 (EntV583) produced by *E. faecalis* V583, and with primers deduced from *entL50A-entL50B* encoding the enterocin L50 (EntL50A and EntL50B) produced by *E. faecium* L50. Sequencing of the amplified gene fragments confirmed the presence in *E. faecalis* DBH18 of *ef1097* and *entL50A-entL50B* as well as the presence of a gene similar to *entL50B*, termed *entJSB*. However, while *entL50A-entL50B* are identical in *E. faecium* L50 and *E. faecalis* DBH18,

nested PCR-derived results suggest that these genes may be found in a different location in both microorganisms. Finally, sequencing by reverse genetic techniques of genes adjacent to *entJSB* in *E. faecalis* DBH18 revealed the existence of twelve consecutive open reading frames (ORFs) including *entL50A-entL50B*. Experiments performed to determine the antimicrobial activity of peptides encoded by *entL50B*, *entL50B*, *entJSA* and *entJSB* by *in vitro* transcription/translation techniques, showed that: (i) *entJSA* and *entJSB* are the minimum requirement for production and functional expression of enterocin JS (EntJSA and EntJSB), (ii) EntL50A and EntL50B showed a higher antimicrobial activity than EntJSA and EntJSB, and (iii) the antimicrobial activity of EntL50A, EntL50B, EntJSA and EntJSB depends on the antimicrobial activity and synergy of each of the single peptides. Finally, analysis by MALDI-TOF MS of the purified bacteriocins from *E. faecalis* DBH18 suggest the presence of a formylated methionine at the N-terminal amino acid sequence of EntJSA and EntJSB.

## CONCLUSIONS

**First.** The fusion of the structural gene encoding mature sakacin A (*sapA*) and its cognate immunity gene (*saiA*), both encoded by *Lb. sakei* Lb706, as well as those encoding chimeras from the N-terminal region from enterocin P (*entP/sapA*) and enterocin A (*entA/sapA*) to different signal peptides (SP), permitted their cloning in expression vectors with inducible or constitutive promoters and their transfer by transformation to other lactic acid bacteria (LAB). The production, antimicrobial activity and specific antimicrobial activity of the SakA and its chimeras produced by the recombinant LAB depended on the signal peptide, the expression vector, the evaluated bacteriocin and the producer LAB. Although most recombinant strains derived from *L. lactis* NZ9000 and *Lb. sakei* Lb706 produced a larger amount of SakA, SakA/EntP and EntA/SakA than the native producer *Lb. sakei* Lb706, only supernatants from *L. lactis* NZ9000 (pNUPS) and *Lb. sakei* Lb706 (pGUS) showed an increased antimicrobial activity (6.4 times higher and 2.9 times higher) and higher specific antimicrobial activity (4.5 times higher and 1.3 times higher), respectively, than the SakA produced by *Lb. sakei* Lb706.

**Second.** The cloning of the structural gene for mature sakacin A (*sapA*) and its chimera *entP/sapA* in the expression vectors pPICZαA and pKLAC2, permitted the production of SakA and EntP/SakA by recombinant yeasts derived from *P. pastoris* X-33 and *K. lactis* GG799. The production of SakA by *P. pastoris* X-33SA was lower than production of EntP/SakA by *P. pastoris* X-33PSA, although the production of SakA and EntP/SakA by these yeasts was 1.8 and 24.2 times greater, respectively, than the SakA produced by *Lb. sakei* Lb706. On the other hand, the production of SakA by *K. lactis* GG799SA and the production of EntP/SakA by *K. lactis* GG799PSA was 11.4 times and 55.2 times greater, respectively, than production of SakA by *Lb. sakei* Lb706. However, the antimicrobial activity and the specific antimicrobial activity of the SakA and EntP/SakA produced by the recombinant yeasts were undetectable or much lower, than deduced from its production in the supernatants of the producer yeasts.

**Third.** The design of synthetic genes deduced from the known amino acid sequence of the enterocin A (EntA), produced by *E. faecium* T136 and the bacteriocin E50-52 (BacE50-52), produced by *E. faecium* B-32746 with the codon usage for their expression by *P. pastoris* X-33 and *K. lactis* GG799 and their cloning in the protein expression vectors pPICZαA and pKLAC2, respectively, permitted the production of bacteriocins with antimicrobial activity. It is noteworthy to notice that the production of EntA by *P. pastoris* X33EAS was 21.4 times greater, its antimicrobial activity 235 times higher and its specific antimicrobial activity 11 times greater, than the EntA produced by *E. faecium* T136. However, the production of EntA by *K. lactis* GG799EAS was 1.2 times higher whereas its antimicrobial activity and specific antimicrobial activity were 2.5 times and 6.1 times lower, respectively, than the EntA produced by *E. faecium* T136. On the other hand, the BacE50-52 only showed antimicrobial activity when purified from the supernatants *P. pastoris* X33B5052S and *K. lactis* GG799B5052S with antagonistic activity against Gram-positive but not against Gram-negative bacteria.

**Fourth.** The replacement of the leader sequence of enterocin A (LS<sub>EntA</sub>) by the signal peptide from protein Usp45 (SP<sub>usp45</sub>) and the subsequent cloning of PS<sub>usp45</sub> fused to mature EntA with its immunity gene (*entA*+ *entiA*) (UAI) in protein expression vectors with inducible pSIP409 and pSIP411 or constitutive pMG36c promoters, permitted construction of plasmids pSIP409UAI, pSIP411UAI and pMGUAI. The transfer of these plasmids by transformation into *Lb. sakei* Lb790, *Lb. plantarum* NC8 and *Lb. casei* CECT475 permitted the production by the host cells of EntA with antimicrobial activity. Of interest is the largest production of EntA by *Lb. sakei* Lb790 (pSIP411UAI) and *Lb. casei* CECT475 (pSIP411UAI) compared to the lower production of EntA by other *Lactobacillus* spp. and *E. faecium* T136. It is noteworthy to notice the large production (4.9 times greater) of EntA by *Lb. casei* CECT475 (pSIP411UAI) with an antimicrobial activity and a specific antimicrobial activity of 22.8 and 4.7 times higher, respectively, than the EntA produced by *E. faecium* T136.

**Fifth.** *E. faecalis* DBH18 encodes the bacteriocin-producing genes *ef1097* and *entL50A-entL50B* and the *entL50A-entL50B*-like genes, termed *entJSA* and *entJSB*. The genes *entL50A-entL50B* are identical in *E. faecium* L50 and *E. faecalis* DBH18 although they may have different genetic location in both microorganisms. Sequencing by reverse genetics of genes adjacent to *entJSA-entJSB* has identified the presence of twelve putative open reading frames (ORFs) including *entJSA-entJSB*. The nucleotide sequence and organization of the ORFs is similar but not identical to adjacent genes close to *entL50A-entL50B* in *E. faecium* L50 and *E. faecium* 6T1a. The evaluation of the antimicrobial activity of the product of genes *entJSA* and *entJSB* by an *in vitro* transcription-translation assay confirm that these genes are responsible of the production and antimicrobial activity of the bacteriocin enterocin JS (EntJSA and EntJSB).

## REFERENCES

- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H. y Schwab, H. (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98:5301-5317.
- Axelsson., L. y Holck, A. (1995). The genes involved in production of and immunity to sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J. Bacteriol.* 177:2125-2137.
- Aymerich, T., Holo, H., Håvarstein, L.S., Hugas, M., Garriga, M. y Nes, I.F. (1996). Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin-family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1676-1682.
- Borrero, J., Jiménez, J.J., Gútiez, L., Herranz, C., Cintas, L.M. y Hernández, P.E. (2011a). Use of the usp45 lactococcal secretion sequence signal sequence to drive the secretion and functional expression of enterococcal bacteriocins in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89:131-143.
- Borrero, J., Kunze, G., Jiménez, J.J., Böer, E., Gútiez, L., Herranz, C., Cintas, L.M. y Hernández, P.E. (2012). Cloning, production and functional expression of the bacteriocin enterocin A, produced by *Enterococcus faecium* T136, by the yeasts *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha* and *Arxula adeninivorans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:5956-5961.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Herranz, C., Håvarstein, L.S., Holo, H., Hernández, P.E. y Nes, I.F. (2000). Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.* 182:6806-6814.
- Denis-Quanquin, S., Lamouroux, L., Lougarre, A., Mahéo, S., Saves, I., Paquereau, L., Demange, P. y Fournier, D. (2007). Protein expression from synthetic genes: selection of clones using GFP. *J. Biotechnol.* 131:223-230.
- De Vuyst, L. y Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13(4):194-9.
- Drider, D., Fimland, G., Héchar, Y., McMullen, L.M. y Prévost, H. (2006). The continuing story of class Iia bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70:564-582.
- Gasser, B., Saloheimo, M., Rinas, U., Dragosits, M., Rodríguez-Carmona, E., Baumann, K., Giuliani, M., Parrilli, E., Branduardi, P., Lang, C., Porro, D., Ferrer, P., Tutino, M.L., Mattanovich, D. y Villaverde, A. (2008). Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview. *Microb. Cell. Fact.* 4:7-11.
- Han, J.H., Choi, Y.S., Kim, W.J., Jeon, Y.H., Lee, S.K., Lee, B.J. y Ryu, K.S. (2010). Codon optimization enhances protein expression of human peptide deformylase in *E. coli*. *Prot. Expr. Purif.* 70:224-230.
- Holo, H. y Nes, I.F. (1989). High-frequency transformation by electroporation of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:3119-3123.

- Karlskås, I.L., Maudal, K., Axelsson, L., Rud, I., Eijsink, V.G.H. y Mathiesen, G. (2014). Heterologous protein secretion in lactobacilli with modified pSIP vectors. *PLoS ONE*. 9(3):e91125.
- Kjos, M., Borrero, J., Opsata, M., Birri, D.J., Holo, H., Cintas, L.M., Snipen, L., Hernández, P.E., Nes, I.F. y Diep, D.B. (2011). Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Microbiology* 157:3256-3267.
- Mathiesen, G., Sveen, A., Piard, J.C., Axelsson, L. y Eijsink, V.G.H. (2008). Heterologous protein secretion by *Lactobacillus plantarum* using homologous signal peptides. *J. Appl. Microbiol.* 105:215-226.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Håvarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V. y Holo, H. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antoine van Leeuwenhoek*. 70:113-128.
- Sørvig, E., Mathiesen, G., Naterstad, K., Eijsink, V.G.H. y Axelsson, L. (2005). High-level, inducible gene expression in *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus plantarum* using versatile expression vectors. *Microbiology* 151:2439-2449.
- Svetoch, E.A. y Stern, N.J. (2010). Bacteriocins to control *Campylobacter spp.* in poultry -a review. *Poult. Sci.* 89:1763-1768.

## **Bibliografía**

---

## **References**





- Achemchem, F., Martínez-Bueno, M., Abrini, J., Valdivia, E. y Maqueda, M. (2005). *Enterococcus faecium* F58, a bacteriocinogenic strain naturally occurring in Jben, a soft, farmhouse goat's cheese made in Morocco. *J. Appl. Microbiol.* 99:141-150.
- Acuña, L., Picariello, G., Sesma, F., Morero, R.D. y Bellomio, A. (2012). A new hybrid bacteriocin, Ent35-MccV, displays antimicrobial activity against pathogenic Gram-positive and Gram-negative bacteria. *FEBS. Open Bio.* 2:12-19.
- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H. y Schwab, H. (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98:5301-5317.
- Ahmadvova, A., Todorov, S.D., Choiset, Y., Rabesona, H., Zadi, T.M., Kuliyeve, A., de Melo Franco, B.D.G., Chobert, J.M. y Hartlé, T. (2013). Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. *Food Cont.* 30:631-641.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Aukrust, T. y Blom, H. (1992). Transformation of *Lactobacillus* strains used in meat and vegetable fermentations. *Food Res. Int.* 25:253-261.
- Aukrust, T.W., Brurberg, M.B. y Nes, I.F. (1995). Transformation of *Lactobacillus* by electroporation. *Methods Mol. Biol.* 47:201-208.
- Axelsson, L. y Holck, A. (1995). The genes involved in production of and immunity to sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J. Bacteriol.* 177:2125-2137.
- Axelsson, L., Holck, A., Biekeland, S.E., Aukrust, T. y Blom, H. (1993). Cloning and nucleotide sequence of a gene from *Lactobacillus sake* Lb706 necessary for sakacin A production and immunity. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2868-2875.
- Aymerich, T., Holo, H., Håvarstein, L.S., Hugas, M., Garriga, M. y Nes, I.F. (1996). Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin-family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1676-1682.
- Barbosa, M.S., Todorov, S.D., Belguesmia, Y., Choiset, Y., Rabesona, H., Ivanova, I.V., Chobert, J.M., Haertlé, T. y Franco, B.D. (2014). Purification and characterization of the bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* MBSa1 isolated from Brazilian salami. *J. Appl. Microbiol.* 116(5):1195-208.
- Basanta, A., Gómez-Sala, B., Sánchez, J., Dzung, B.D., Herranz, C., Hernández, P.E. y Cintas, L.M. (2010). Use of the yeast *Pichia pastoris* as an expression host for secretion of enterocin L50, a leaderless two-peptide (L50A and L50B) bacteriocin from *Enterococcus faecium* L50. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:3314-3324.
- Basanta, A., Herranz, C., Gutiérrez, J., Criado, R., Hernández, P.E. y Cintas, L.M. (2009). Development of bacteriocinogenic strains of *Saccharomyces cerevisiae* heterologously expressing and secreting the leaderless enterocin L50 peptides L50A and L50B from *Enterococcus faecium* L50. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:2382-2392.
- Batdorj, B., Dalgalarondo, M., Choiset, Y., Pedroche, J., Métro, F., Prévost, H., Chobert, J.M. y Hartle, T. (2006). Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. *J. Appl. Microbiol.* 101:837-848.
- Beaulieu, L., Groleau, D., Míguez, C.B., Jetté, J.F., Aomari, H. y Subirade, M. (2005). Production of pediocin PA-1 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* reveals unexpected inhibition of its biological activity due to the presence of collagen-like material. *Prot. Expr. Purif.* 43:111-125.

- Berlec, A. y Štrukelj, B. (2009). Large increase in brazzein expression achieved by changing the plasmid/strain combination of the NICE system in *Lactococcus lactis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 48:750-755.
- Bertazzoni, E., Donelli, G., Midtvedt, T., Nicoli, J. y Sanz, Y. (2013). Probiotics and clinical effects: is the number what counts? *J. Chemother.* 25(4):193-212.
- Böer, E., Steinborn, G., Kunze, G. y Gellissen, G. (2007). Yeast expression platforms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77:513-523.
- Bøhle, L.A., Riaz, T., Egge-Jacobsen, W., Skaugen, M., Busk, Ø.L., Eijsink, V.G.H. y Mathiesen, G. (2011). Identification of surface proteins in *Enterococcus faecalis* V583. *BMC Genomics.* 12:135.
- Borrero, J. (2011). Ph.D thesis. Universidad Complutense de Madrid. Spain.
- Borrero, J., Brede, D.A., Skaugen, M., Diep, D.B., Herranz, C., Nes, I.F., Cintas, L.M. y Hernández, P.E. (2011c). Characterization of garvicin ML, a novel circular bacteriocin produced by *Lactococcus garvieae* DCC43, isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Appl. Environ. Microbiol.* 77:369-373.
- Borrero, J., Jiménez, J.J., Gútiérrez, L., Herranz, C., Cintas, L.M. y Hernández, P.E. (2011a). Use of the usp45 lactococcal secretion sequence signal sequence to drive the secretion and functional expression of enterococcal bacteriocins in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89:131-143.
- Borrero, J., Jiménez, J.J., Gútiérrez, L., Herranz, C., Cintas, L.M. y Hernández, P.E. (2011b). Protein expression vector and secretion signal peptide optimization to drive the production, secretion, and functional expression of the bacteriocin enterocin A in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* 156:76-86.
- Borrero, J., Kunze, G., Jiménez, J.J., Böer, E., Gútiérrez, L., Herranz, C., Cintas, L.M. y Hernández, P.E. (2012). Cloning, production and functional expression of the bacteriocin enterocin A, produced by *Enterococcus faecium* T136, by the yeasts *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha* and *Arxula adeninivorans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:5956-5961.
- Bourgogne, A., Hilsenbeck, S.G., Dunne, G.M. y Murray, B.E. (2006). Comparison of OG1RF and a isogenic *fsrB* deletion mutant by transcriptional analysis: the *Fsr* system of *Enterococcus faecalis* is more than the activator of gelatinase and serine protease. *J. Bacteriol.* 188:2875-2884.
- Brandão, A., Almeida, T., Muñoz-Atienza, e., Torres, C., Igrejas, G., Hernández, P.E., Cintas, L.M., Poeta, P. y Herranz, C. (2010). Antimicrobial activity and occurrence of bacteriocin structural genes in *Enterococcus spp.* of human and animal origin isolated in Portugal. *Arch. Microbiol.* 192:927-936.
- Bryan, E.M., Bae, T., Kleerebezem, M. y Dunne, G.M. (2000). Improved vectors for nisin-controlled expression in gram-positive bacteria. *Plasmid.* 44:183-190.
- Casalta, E. y Montel, M.C. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126:271-273.
- Casaus, P., Nilsen, T., Cintas, L.M., Nes, I.F., Hernández, P.E. y Holo, H. (1997). Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiol.* 143:2287-2294.
- Chang, S.W., Lee, G.C. y Shaw, J.F. (2006). Codon optimization of *Candida rugosa* lip1 gene for improving expression in *Pichia pastoris* and biochemical characterization of the purified recombinant LIP1 lipase. *J. Agric. Food Chem.* 54:815-822.
- Chen, C.A., Wang, T.Y., Varadharaj, S., Reyes, L.A., Hermann, C., Talukder, M.A.H., Chen, Y.R., Druhan, L.J. y Zweier, J.L. (2010). S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function. *Nature.* 468:1115-1120.

- Chen, Y., Ludescher, R.D. y Montville, T.J. (1997). Electrostatic interactions but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4770-4777.
- Cintas, L.M. (1995). Ph.D thesis. Universidad Autónoma de Madrid. Spain.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Håvarstein, L.S., Hernández, P.E. y Nes, I.F. (1997). Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4321-4330.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Herranz, C., Håvarstein, L.S., Holo, H., Hernández, P.E. y Nes, I.F. (2000). Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.* 182:6806-6814.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Herranz, C., Nes I.F. y Hernández, P.E. (2001). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci. Tech. Int.* 7:281-305.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Holo, H., Hernández, P.E., Nes, I.F. y Håvarstein, L.S. (1998). Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.* 180:1988-1994.
- Clewell, D.B. (1990). Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 9:90-102.
- Coburn, P.S., Baghdadyan, A.S., Dolan, G.T. y Shankar, N. (2007). Horizontal transfer of virulence genes encoded on the *Enterococcus faecalis* pathogenicity island. *Mol. Microbiol.* 63:530-544.
- Coconnier, M.H., Lievin, V., Hemery, E. y Servin, A.L. (1998). Antagonistic activity against *Helicobacter* infection in vitro and in vivo by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4573-4580.
- Colussi, P.A. y Taron, C.H. (2005). *Kluyveromyces lactis* LAC4 promoter variants that lack function in bacteria but retain full function in *K. lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:7092-7098.
- Corr, S.D., Li, Y., Riedel, C.U., O'Toole, P.W., Hill, C. y Gahan, G.G.M. (2007). Bacteriocin production as a mechanism for the anti-infective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104:7617-7621.
- Corr, S.C., Hill, C. y Gahan, C.G.M. (2009). Understanding the mechanisms by which probiotics inhibit gastrointestinal pathogens. *Adv. Food Nutr. Res.* 56:1-15.
- Cotter, P.D., Hill, C. y Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:777-788.
- Cotter, P.D., Ross, R.P. y Hill, C. (2013). Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nature. Microbiol. Rev.* 11:95-105.
- Cregg, J.M., Cereghino, J.L., Shi, J. y Higgins, D.R. (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.* 16:23-52.
- Criado, R., Diep, D., Aakra, Å, Gutiérrez, J., Nes, I.F., Hernández, P.E. y Cintas, L.M. (2006a). The complete sequence of the enterocin Q-encoding plasmid pCIZ2 from the multiple bacteriocin producer *Enterococcus faecium* L50 and genetic characterization of enterocin Q production and immunity. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:6653-6666.
- Criado, R., Gutiérrez, J., Martín, M., Herranz, C., Hernández, P.E. y Cintas, L.M. (2006b). Immunochemical characterization of temperature-regulated production of enterocin L50 (EntL50A and EntL50B), enterocin P and enterocin Q by the multiple bacteriocin producer strain *Enterococcus faecium* L50. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:7634-7643.
- Criado, R. (2006c). Caracterización genética e inmunoquímica de la producción de enterocinas L50, P y Q por *Enterococcus faecium* L50. Secuencia nucleotídica y análisis funcional de los plásmidos pCIZ1 y pCIZ2. Ph.D. Thesis, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain.

- Darmon, E., Noone, D., Masson, A., Bron, S., Kuipers, O.P., Devine, K.M. y van Dijl, J.M. (2002). A novel class of heat and secretion stress-responsive genes is controlled by the autoregulated CsrRS two-component system of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 184:5661-5671.
- Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C. y Ross, P. (2006). Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* 16:1058-1071.
- Demain, A. y Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol. Adv.* 27:297-306.
- Denis-Quanquin, S., Lamouroux, L., Lougarre, A., Mahéo, S., Saves, I., Paquereau, L., Demange, P. y Fournier, D. (2007). Protein expression from synthetic genes: selection of clones using GFP. *J. Biotechnol.* 131:223-230.
- De Ruyter, P.G.G.A., Kuipers, O.P. y de Vos, W.M. (1996). Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3662-3667.
- De Vuyst, L. y Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13(4):194-9.
- Dezwaan, D.C., Mequio, M.J., Littell, J., Allen, J.P., Rossbach, S. y Pybus, V. (2007). Purification and characterization of enterocin 62-6, a two-peptide bacteriocin, produced by a vaginal strain of *Enterococcus faecium*: Potential significance in bacterial vaginosis. *Microb. Ecol. Health Dis.* 19:241-250.
- Diaz, M., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., Fernández, M., Santos Soler-González, A., Ramírez-Rodrigo, H. y Maqueda, M. (2003). Characterization of a new operon, as-48EFGH, from the as-48 gene cluster involved in immunity to enterocin AS-48. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1229-1236.
- Diep, D.B., Axelsson, L., Grefslis, C. y Nes, I.F. (2000). The synthesis of the bacteriocin sakacin A is a temperature-sensitive process regulated by a pheromone peptide through a three-component regulatory system. *Microbiology.* 146:2155-2160.
- Diep, D.B., Mathiesen, G., Eijsink, V.G.H. y Nes, I.F. (2009b). Use of lactobacilli and their pheromone-based regulatory mechanism in gene expression and drug delivery. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 10:62-73.
- Diep, D.B., Skaugen, M., Salehian, Z., Holo, H. y Nes, I.F. (2007). Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104:2384-2389.
- Diep, D.B., Straume, D., Kjos, M., Torres, C. y Nes, I.F. (2009a). An overview of the mosaic bacteriocin pln loci from *Lactobacillus plantarum*. *Peptides.* 30:1562-1574.
- Dobson, A., Cotter, P.D., Ross, R.P. y Hill, C. (2012). Bacteriocin production: a probiotic trait? *Appl. Environ. Microbiol.* 78:1-6.
- Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L.M. y Prévost, H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70:564-582.
- Driessen, A.J.M. y Nouwen, N. (2007). Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu. Rev. Biochem.* 77:643-667.
- Eijsink, V.G.H., Brurberg, M., Hans Middelhoven, P. y Nes, I.F. (1996). Induction of bacteriocin production in *Lactobacillus sake* by a secreted peptide. *J. Bacteriol.* 178:2232-223.
- Eijsink, V.G.H., Skeie, M., Middelhoven, P.H., Brurberg, M.B. y Nes, I.F. (1998). Comparative studies of class II bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3275-3281.
- Field, D., Begley, M., O'Connor, P.M., Daly, K.M., Hugenholtz, F., Cotter, P.D., Hill, C. y Ross, R.P. (2012). Bioengineered nisin A derivatives with enhanced activity against both Gram positive and gram negative pathogens. *PLoS ONE.* 7(10): e46884.
- Fimland, G., Blingsmo, O.R., Sletten, K., Jung, G., Nes, I.F. y Nissen-Meyer, J. (1996). New biologically active hybrid bacteriocins constructed by combining regions from various pediocin-

- like bacteriocins: the C-terminal region is important for determining specificity. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3313-3318.
- Floriano, B., Ruíz-Barba, J.L. y Jiménez-Díaz, R. (1998). Purification and genetic characterization of enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4883-4890.
- Foulquié-Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P. y De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* 106:1-24.
- Fox, J.M. y Erill, I. (2010). Relative codon adaptation: a generic codon bias index for prediction of gene expression. *DNA Res.* 17:185-196.
- Franz, C.M., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W. y Gálvez, A. (2011). Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 151:125-140.
- Franz, C.M., Muscholl-Silverhorn, A.B., Yousif, N.M.K., Vancannet, M., Swings, J. y Holzapfel, W.H. (2001). Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:4835-4839.
- Franz, C.M., Stiles, M.E., Schleifer, K.H. y Holzapfel, W.H. (2003). Enterococci in foods-a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 105-122.
- Franz, C.M., van Belkum, M.J., Holzapfel, W.H., Abriouel, H. y Gálvez, A. (2007). Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS. Microbiol. Rev.* 31:293-310.
- Freitas, D.A., Leclerc, S., Miyoshi, A., Oliveira, S.C, Sommer, P.S.M., Rodrigues, L., Correa, A., Gautier, M., Langella, P., Azevedo, V.A. y Le Loir, Y. (2005). Secretion of *Streptomyces tendae* antifungal protein 1 by *Lactococcus lactis*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38:1585-1592.
- Fujita, K., Ichimasa, S., Zendo, T., Koga, S., Yoneyama, F., Nakayama, J. y Sonomoto, K. (2007). Structural analysis and characterization of lacticin Q, a novel bacteriocin belonging to a new family of unmodified bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:2871-2877.
- Gabrielsen, C., Brede, D.A., Salehian, Z., Nes, I.F. y Diep, D.B. (2014). Functional genetic analysis of the garML gene cluster in *Lactococcus garvieae* DCC43 gives new insights into circular bacteriocin biosynthesis. *J. Bacteriol.* 196:911-919.
- Gajic, O., Buist, G., Kojic, M., Topisirovic, L., Kuipers, O.P. y Kok, J. (2003). Novel mechanism of bacteriocin secretion and immunity carried out by lactococcal multidrug resistance proteins. *J. Biol. Chem.* 278:34291-34298.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R.L. y Omar, N.B. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 120:51-70.
- Gálvez, A., López, R.L., Abriouel, H., Valdivia, E. y Omar, N.B. (2008). Application of bacteriocins in the control of food borne pathogenic and spoilage bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* 28:125-152.
- Gao, Z., Li, Z., Zhang, Y., Huang, H., Li, M., Zhou, L., Tang, Y., Yao, B. y Zhang, W. (2012). High-level expression of the *Penicillium notatum* glucose oxidase gene in *Pichia pastoris* using codon usage optimization. *Biotechnol. Lett.* 34:507-514.
- Gasser, B., Saloheimo, M., Rinas, U., Dragosits, M., Rodríguez-Carmona, E., Baumann, K., Giuliani, M., Parrilli, E., Branduardi, P., Lang, C., Porro, D., Ferrer, P., Tutino, M.L., Mattanovich, D. y Villaverde, A. (2008). Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview. *Microb. Cell. Fact.* 4:7-11.
- Gasson, M.J. (1983). Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J. Bacteriol.* 154:1-9.
- Gellissen, G., Kunze, G., Gaillardin, C., Cregg, J.M., Berardi, E., Veenhuis, M., y van der Klei, I. (2005). New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and

- Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adeninivorans* and *Yarrowia lipolytica*. A comparison. *FEMS Yeast Res.* 5:1079-1096.
- Gillor, O., Etzion, A. y Riley, M.A. (2008). The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl Microbiol. Biotechnol.* 81:591-606.
- Gutiérrez, J., Criado, R., Citti, R., Martín, M., Herranz, C., Fernández, M.F., Cintas, L.M. y Hernández, P.E. (2004). Performance and application of polyclonal anti-peptide antibodies specific for the enterococcal bacteriocin enterocin P. *J. Agric. Food Chem.* 52:2247-2255.
- Gutiérrez, J., Criado, R., Martín, M., Herranz, C., Cintas, L.M. y Hernández, P.E. (2005). Production of enterocin P, an antilisterial pediocin-like bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13, in *Pichia pastoris*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:3004-3008.
- Gutiérrez, J., Larsen, R., Cintas, L.M., Kok, J. y Hernández, P.E. (2006). High-level heterologous production and functional expression of the sec-dependent enterocin P from *Enterococcus faecium* P13 in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72:41-51.
- Gutiérrez, L., Borrero, J., Jiménez, J.J., Gómez-Sala, B., Recio, I., Cintas, L.M., Herranz, C. y Hernández, P.E. (2014). Genetic and biochemical evidence that recombinant *Enterococcus spp.* strains expressing gelatinase (GelE) produce bovine milk-derived hydrolysates with high angiotensin converting enzyme-inhibitory activity (ACE-IA). *J. Agric. Food Chem.* (in press).
- Gutiérrez, L., Gómez-Sala, B., Recio, I., del Campo, R., Cintas, L.M., Herranz, C. y Hernández, P.E. (2013). *Enterococcus faecalis* strains from food, environmental, and clinical origin produce ACE-inhibitory peptides and other bioactive peptides during growth in bovine skim milk. *Int. J. Food. Microbiol.* 166:93-101.
- Halbmayer, E., Mathisien, G., Nguyen, T-H., Maischberger, T., Peterbauer, C.K., Eijssink, C.G.H. y Haltrich, D. (2008). High-level expression of recombinant  $\beta$ -galactosidases in *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus sakei* using a sakacin P-based expression system. *J. Agric. Food. Chem.* 56:4710-4719.
- Han, J.H., Choi, Y.S., Kim, W.J., Jeon, Y.H., Lee, S.K., Lee, B.J. y Ryu, K.S. (2010). Codon optimization enhances protein expression of human peptide deformylase in *E. coli*. *Protein Expr. Purif.* 70:224-230.
- Haugen, G.S., Fimland, G. y Nissen-Meyer, J. (2011). Mutational analysis of residues in the helical region of the class IIa bacteriocin pediocin PA-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:1966-1972.
- Hassan, M., Kjos, M., Nes, I.F., Diep, D.B. y Lotfipour, F. (2012). Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *J. Appl. Microbiol.* 113(4):723-736.
- Håvarstein, L.S., Diep, D.B. y Nes, I.F. (1995). A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitantly with export. *Mol. Microbiol.* 16, 229-240.
- Herranz, C. y Driessen, A.J.M. (2005). Sec-mediated secretion of bacteriocin enterocin P by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1959-1963.
- Hoang, K.V., Stern, N.J. y Lin, J. (2011). Development and stability of bacteriocin resistance in *Campylobacter spp.* *J. Appl. Microbiol.* 111:1544-1550.
- Holck, A., Axelsson, L., Birkeland, S.E., Aukrust, T. y Blom, H. (1992). Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J. Gen. Microbiol.* 138:2715-2720.
- Holo, H. y Nes, I.F. (1989). High-frequency transformation by electroporation of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:3119-3123.
- Hyink, O., Balakrishnan, M. y Tagg, J.R. (2005). *Streptococcus rattus* strain BHT produces both a class I two-component lantibiotic and a class II bacteriocin. *FEMS Microbiol. Lett.* 252:235-241.

- Hwang, B., Hwang, J.S., Lee, J. y Lee, D.G. (2011). The antimicrobial peptide psacothasin induces reactive oxygen species and triggers apoptosis in *Candida albicans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 405:267-271.
- Iwatani, S., Yoneyama, F., Miyashita, S., Zendo, T., Nakayama, J. y Sonomoto, K. (2012). Identification of genes involved in the secretion and self-immunity of lacticin Q, an unmodified leaderless bacteriocin from *Lactococcus lactis* QU 5. *Microbiology*. 157:2927-2935.
- Iwatani, S., Zendo, T., Yoneyama, F., Nakayama, J. y Sonomoto, K. (2007). Characterization and structure analysis of a novel bacteriocin, lacticin Z, produced by *Lactococcus lactis* QU 14. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71:1984-1992.
- Izquierdo, E., Bednarczyk, A., Schaeffer, C., Cai, Y., Marchioni, E., Van Dorsselaer, A. y Ennahar, S. (2008). Production of enterocins L50A, L50B, and IT, a new enterocin, by *Enterococcus faecium* IT62, a strain isolated from Italian ryegrass in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:1917-1923.
- Jiménez, J.J., Borrero, J., Diep, D.B., Gútiérrez, L., Nes, I.F., Herranz, C., Cintas, L.M. y Hernández, P.E. (2013). Cloning, production and functional expression of the bacteriocin sakacin A (SakA) and two SakA-derived chimeras in lactic acid bacteria (LAB) and the yeasts *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40:977-993.
- Jiménez, J.J., Borrero, J., Gútiérrez, L., Arbulu, S., Herranz, C., Cintas, L.M. y Hernández, P.E. (2014). Use of synthetic genes for cloning, production and functional expression of the bacteriocins enterocin A and bacteriocin E 50-52 by *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Biotechnol.* 56(6):571-83.
- Joerger, R.D. (2003). Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poultry Sci.* 82:640-647.
- Johnsen, L., Fimland, G., Eijsink, V. y Nissen-Meyer, J. (2000). Engineering increased stability in the antimicrobial peptide pediocin PA-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4798-4802.
- Kahn, H., Flint, S. y Yu, P.L. (2010). Enterocins in food preservation. *Int. J. Food. Microbiol.* 141:1-10.
- Kang, B.S., Seo, J.G., Lee, G.S., Kim, J.H., Kim, S.Y., Han, Y.W., Kang, H., Kim, H.O., Rhee, J.H., Chung, M.J. y Park, Y.M. (2009). Antimicrobial activity of enterocins from *Enterococcus faecalis* SL-5 against *Propionibacterium acnes*, the causative agent in acne vulgaris, and its therapeutic effect. *J. Microbiol.* 47:101-109.
- Karlskås, I.L., Maudal, K., Axelsson, L., Rud, I., Eijsink, V.G.H. y Mathiesen, G. (2014). Heterologous protein secretion in lactobacilli with modified pSIP vectors. *PLoS ONE*. 9(3):e91125.
- Katla, T., Naterstad, K., Vancanneyt, M., Swings, J. y Axelsson, L. (2003). Differences in susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to sakacin P, sakacin A, pediocin PA-1, and nisin. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4431-4437.
- Kim, J.H. y Mills, D.A. (2007). Improvement of a nisin-inducible expression vector for use in lactic acid bacteria. *Plasmid*. 58:275-283.
- Kjos, M., Borrero, J., Opsata, M., Birri, D.J., Holo, H., Cintas, L.M., Snipen, L., Hernández, P.E., Nes, I.F. y Diep, D.B. (2011). Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Microbiology*. 157:3256-3267.
- Kjos, M., Salehian, Z., Nes, I.F. y Diep, D.B. (2010). An extracellular loop of mannose phosphotransferase system component IIC is responsible for the specific targeting by class IIa bacteriocins. *J. Bacteriol.* 192:5906-5913.
- Kleerebezem, M., Beerthuyzen, M.M., Vaughan, E.E., de Vos, W. y Kuipers, O.P. (1997). Controlled gene expression systems for lactic acid bacteria: Transferable nisin-inducible expression



- cassettes for *Lactococcus*, *Leuconostoc*, and *Lactobacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4581-4584.
- Klosterman, K., Crispie, F., Flynn, J., Ross, R.P., Hill, C. y Meaney, W. (2008). Intramammary infusion of a live culture of *Lactococcus lactis* for treatment of bovine mastitis: comparison with antibiotic treatment in field trials. *J. Dairy Res.* 75:365-373.
- Kuipers, O.P., de Ruyter, P.G.G.A., Kleerebezem, M. y de Vos, W.M. (1998). Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* 64:15-21.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J. and De Keersmacker, S.C.J. (2008). Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72:728-764.
- Lee, Y.K., Ho, P.S., Low, C.S., Arvilommi, H. y Salminen, S. (2004). Permanent colonization by *Lactobacillus casei* is hindered by the low rate of cell division in mouse gut. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:670-674.
- Le Loir, Y., Gruss, A., Ehrlich, D. y Langella, P. (1998). A nine-residue synthetic propeptide enhances secretion efficiency of heterologous proteins in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 180:1895-1903.
- Le Loir, Y., Nouaille, S., Commissaire, J., Bretigny, L., Gruss, A. y Langella, P. (2001). Signal peptide and propeptide optimization for heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:4119-4127.
- Li, P., Beckwith, J. y Inouye, H. (1988). Alteration of the amino terminus of the mature sequence of a periplasmic protein can severely affect protein export in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7685-7689.
- Lin, Y., Cheng, G., Wang, X. y Clark, T.G. (2002). The use of synthetic genes for the expression of ciliate proteins in heterologous systems. *Gene*. 288:85-94
- Liu, X., Vederas, J.C., Whittall, R.M., Zheng J., Stiles, M.E., Carlsson, D., Franz, C.M.A.P., McMullen, L. y van Belkum, M.J. (2011). Identification of an N-terminal formylated, two-peptide bacteriocin from *Enterococcus faecalis* 710C. *J. Agric. Food Chem.* 59:5602-5608.
- Lohans, C.T., Towle, K.M., Miskolzie, M., McKay, R.T., van Belkum, M.J., McMullen, L.M. y Vederas, J.C. (2013). Solution structures of the linear leaderless bacteriocins enterocin 7A and 7B resemble carnocyclin A, a circular antimicrobial peptide. *Biochemistry*. 52:3987-3994.
- Lux, T., Nuhn, M., Hakenbeck, R. y Reichmann, P. (2007). Diversity of bacteriocins and activity spectrum in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 189:7741-7751.
- Maldonado-Barragán, A., Ruíz-Barba, J.L. y Jiménez-Díaz, R. (2009). Knockout of three component regulatory systems reveal that the apparently constitutive plantaricin-production phenotype shown by *Lactobacillus plantarum* on solid medium is regulated via quorum sensing. *Int. J. Food Microbiol.* 130:35-42.
- Mann, M. y Jensen, O.N. (2003). Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat. Biotechnol.* 21:255-261.
- Martín, M., Gutiérrez, J., Criado, R., Herranz, C., Cintas, L.M. y Hernández, P.E. (2006). Genes encoding bacteriocins and their expression, and potential virulence factors of enterococci isolated from wood pigeons (*Columba palumbus*). *J. Food Prot.* 69:520-531.
- Martín, M., Gutiérrez, J., Criado, R., Herranz, C., Cintas, L.M. y Hernández, P.E. (2007a). Chimeras of mature pediocin PA-1 fused to the signal peptide of enterocin P permits the cloning, production, and expression of pediocin PA-1 in *Lactococcus lactis*. *J. Food. Prot.* 70:2792-2798.
- Martín, M., Gutiérrez, J., Criado, R., Herranz, C., Cintas, L.M. y Hernández, P.E. (2007b). Cloning, production and expression of the bacteriocin enterocin A produced by *Enterococcus faecium* PLBC21 in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76:667-675.

- Martínez, J.M., Kok, J., Sanders, J.W. y Hernández, P.E. (2000). Heterologous co-production of enterocin A and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*: detection by specific peptide-directed antibodies. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3543-3549.
- Martín-Platero, A.M., Valdivia, E., Ruiz-Rodríguez, M., Soler, J.J., Martín-Vivaldi, M., Maqueda, M. y Martínez-Bueno, M. (2006). Characterization of antimicrobial substances produced by *Enterococcus faecalis* MRR 10-3, isolated from the uropygial gland of the Hoopoe (*Upupa epops*). *Appl. Environ. Microbiol.* 72:4245-4249.
- Masuda, Y., Zendo, T., Sawa, N., Perez, R.H., Nakayama, J. y Sonomoto, K. (2012). Characterization and identification of weissellicin Y and weissellicin M, novel bacteriocins produced by *Weissella hellenica* QU 13. *J. Appl. Microbiol.* 112:99-108.
- Mathiesen, G., Namløs, H.M., Risøen, P.A., Axelsson, L. y Eijsink, V.G.H. (2003). Use of bacteriocin promoters for gene expression in *Lactobacillus plantarum* C11. *J. Appl. Microbiol.* 96:819-827.
- Mathiesen, G., Sørvig, E., Blatny, E., Naterstad, K., Axelsson, L. y Eijsink, V.G.H. (2004). High-level gene expression in *Lactobacillus plantarum* using a pheromone-regulated bacteriocin promoter. *Appl. Microbiol.* 39:137-143.
- Mathiesen, G., Sveen, A., Brurberg, M.B., Fedriksen, L., Axelsson, L. y Eijsink, V.G.H. (2009). Genome-wide analysis of signal peptide functionality in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *BMC Genomics.* 10:425.
- Mathiesen, G., Sveen, A., Piard, J.C., Axelsson, L. y Eijsink, V.G.H. (2008). Heterologous protein secretion by *Lactobacillus plantarum* using homologous signal peptides. *J. Appl. Microbiol.* 105:215-226.
- Mathur, H., O'Connor, P.M., Cotter, P.D., Hill, C. y Ross, R.P. (2014). Heterologous expression of thuricin CD immunity genes in *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 58(6):3421-8.
- Messaoudi, S., Kergourlay, G., Dalgarrondo, M., Choiset, Y., Ferchichi, M., Prevost, H., Pilet, M-F., Chobert, J-M., Manai, M. y Dousset, X. (2012). Purification and characterization of a new bacteriocin active against *Campylobacter* produced by *Lactobacillus salivarius* SMXD51. *Food Microbiol.* 32:129-134.
- Mierau, I. and Kleerebezem, M. (2005). 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68:705-717.
- Miller, L.E. (2014). Probiotic Claims for Gastrointestinal Conditions: Stretching the Truth? *J. Diet. Suppl.* Publicado en línea.
- Montalbán-López, M., Sánchez-Hidalgo, M., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M. y Maqueda, M. (2011). Are bacteriocins underexploited? Novel applications for old antimicrobials. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 12:1205-1220.
- Moraïs, S., Shterzer, N., Grinberg, I.R., Mathiesen, G., Eijsink, V.G.H., Axelsson, L., Lamed, R., Bayer, E.A. y Mizrahi, I. (2013). Establishment of a *Lactobacillus plantarum* cell consortium for cellulase-xylanase synergistic interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:5242-5249.
- Morello, E., Bermúdez-Humarán, L.G., Llull, D., Solé, V., Miraglio, N., Langella, P. y Poquet, I. (2008). *Lactococcus lactis*, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 14:48-58.
- Moreno, M.R., Leistner, J.J., Tee, L.K., Ley, C., Rusul, G., Vancanneyt, M. y De Vuyst, L. (2002). Microbial analysis of Malaysian tempeh, and characterization of two bacteriocins produced by isolates of *Enterococcus faecium*. *J. Appl. Microbiol.* 92:147-157.
- Møretrø, T., Naterstad, K., Wang, E., Aesen, I.M., Chaillou, S., Zagorec, M. y Axelsson, L. (2005). Sakacin P non-producing *Lactobacillus sakei* strains contain homologues of the sakacin P gene cluster. *Res. Microbiol.* 156(9):949-960.

- Murray, B.E., Mederski-Samoraj, B.D., Foster, S.K., Brunton, L. y Harford, P. (1986). In vitro studies of plasmid-mediated penicillinase from *Streptococcus faecalis* suggests a staphylococcal origin. *J. Clin. Investig.* 77:289-293.
- Natale, P., Brügger, T. y Driessen, A.J.M. (2008). Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane: distinct translocases and mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta.* 1778:1735-1756.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Håvarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V. y Holo, H. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antoine van Leeuwenhoek.* 70:113-128.
- Nes, I.F., Diep, D.B. y Holo, H. (2007). Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol.* 189:1189-1198.
- Nes, I.F., Diep, D.B. y Ike, Y. (2014). Enterococcal bacteriocins and antimicrobial proteins that contribute to niche control. In: *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Editor: Gilmore, M.S., Associate editors: Clewell, D.B., Ike, Y., Shankar, N., editors. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary.
- Nes, I.F., Yoon, S.S. y Diep, D.B. (2007). Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: A review. *Food Sci. Biotechnol.* 16:675-690.
- Netz, D.J.A., Sahl, H.G., Marcolino, J., Dos Santos Nascimento, S., Soares de Oliveira, M., Bento Soares, M. y Bastos, M.C.F. (2001). Molecular characterisation of aureocin A70, a multiple bacteriocin isolated from *Staphylococcus aureus*. *J. Mol. Biol.* 311:939-949.
- Netz, D.J.A., Pohl, R., Beck-Sickinger, A.G., Selmer, T., Pierik, A.J., Bastos, M.C.F. y Sahl, H.G. (2002). Biochemical characterisation and genetic analysis of aureocin A53, a new, atypical bacteriocin from *Staphylococcus aureus*. *J. Mol. Biol.* 319:745-756.
- Nijland, R., Heerlien, R., Hamoen, L.W. y Kuipers, O.P. (2007). Changing a single amino acid in *Clostridium perfringens* alpha-toxin affects the efficiency of heterologous secretion in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:1586-1593.
- Nilsen, T., Nes, I.F. y Holo, H. (1998). An exported inducer regulates bacteriocin production in *Enterococcus faecium* CTC492. *J. Bacteriol.* 180:1848-1854.
- O'Keefe, T., Hill, C. y Ross, R.P. (1999). Characterization and heterologous expression of the genes encoding enterocin A production, immunity and regulation in *Enterococcus faecium* DPC1146. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1506-1515.
- Öberg, F., Sjöman, J., Conner, M.T., Bill, R.M. y Hedfalk, K. (2011). Improving recombinant eukaryotic membrane protein yields in *Pichia pastoris*: The importance of codon optimization and clone selection. *Mol. Membr. Biol.* 28:398-411.
- Ogawa, T., Asai, Y., Yasuda, K. y Sakamoto, H. (2005) Oral immunoadjuvant activity of a new symbiotic *Lactobacillus casei* subsp. *casei* in conjunction with dextran in BALB/c mice. *Nutr. Res.* 25:295-304.
- Oman, T.J., Boettcher, J.M., Wang, H., Okalibe, X.N. y van der Donk, W. (2011). Sublancin is not a lantibiotic but an S-linked glycopeptide. *Nature Chem. Biol.* 7:78-80.
- Paulsen, I., Banerjee, L., Myers, G.S.A., Nelson, K.E., Seshadri, R., Read, T.D., Fouts, D.E., Eisen, J.A., Gill, S.R., Heidelberg, J.F., Tettelin, H., Dodson, R.J., Umayam, L., Brinkac, L., Beanan, M., Daugherty, S., DeBoy, R.T., Durkin, S., Kolonay, J., Madupu, R., Nelson, W., Vamathevan, J., Tran, B., Upton, J., Hansen, T., Shetty, J., Khouri, H., Utterback, T., Radune, D., Ketchum, K.A., Dougherty, B.A. y Fraser, C.M. (2003). Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science.* 299:2071-2074.
- Pavan, S., Hols, P., Delcour, J., Geoffroy, M.C., Grangette, C., Kleerebezem, M. y Mercenier, A. (2000). Adaptation to the nisin-controlled expression system in *Lactobacillus plantarum*: a tool to study in vivo biological effects. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4427-4432.

- Perin, L.M., Miranda, R.O., Todorov, S.D., Franco, B.D. y Nero, L.A. (2014). Virulence, antibiotic resistance and biogenic amines of bacteriocinogenic lactococci and enterococci isolated from goat milk. *Int. J. Food Microbiol.* 185:121-6.
- Pillar, C.M. y Gilmore, M.S. (2004). Enterococcal virulence - pathogenicity island of *Enterococcus faecalis*. *Front. Biosci.* 9:2335-2346.
- Pineiro, M. y Stanton, C. (2007). Probiotic bacteria: legislative framework-requirements to evidence basis. *J. Nutr.* 137:850S-853S.
- Potempa, J. y Pike, R.N. (2009). Corruption of innate immunity by bacterial proteases. *J. Innate Immun.* 1:70-87.
- Quadri L.E., Sailer M., Terebiznic, M.R., Roy K.L., Vederas, J.C. y Stiles, M.E. (1995) Characterization of the protein conferring immunity to the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 and expression of carnobacteriocins B2 and BM1. *J. Bacteriol.* 177(5): 1144-51.
- Riboulet-Bisson, E., Sturme, M.H.J., Jeffery, I.B., O'Donnell, M.M., Neville, B.A., Forde, B.M., Claesson, M.J., Harris, H., Gardiner, G.E., Casey, P.G., Lawlor, P.G., O'Toole, P.W. and Ross, R.P. (2012). Effect of *Lactobacillus salivarius* bacteriocin Abp118 on the mouse and pig intestinal microbiota. *PLoS ONE* 7(2): e31113.
- Richard, C., Drider, D., Elmorjani, K., Marion, D. y Prevost, H. (2004). Heterologous expression and purification of active divercin V41, a class IIa bacteriocin encoded by a synthetic gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186:4276-4284.
- Rojas-Ronquillo, R., Cruz-Guerrero, A., Flores-Nájera, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., Reyes-Grajeda, J.P., Jiménez-Guzmán, J. y García-Garibay, M. (2012). Antithrombotic and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties of peptides released from bovine casein by *Lactobacillus casei* Shirota. *Int. Dairy. J.* 26:147-14.
- Rud, I., Jensen, P.R., Naterstad, K. y Axelsson, L. (2006). A synthetic promoter library for constitutive gene expression in *Lactobacillus plantarum*. *Microbiol.* 152:1011-1019.
- Ruiz-Barba, J.L., Floriano, B., Maldonado-Barragán, A. y Jiménez-Díaz, R. (2007). Molecular analysis of the 21-kb bacteriocin-encoding plasmid pEF1 from *Enterococcus faecium* 6T1a. *Plasmid.* 57:175-181.
- Ruiz-Rodríguez, M., Martínez-Bueno, M., Martín-Vivaldi, M., Valdivia E. y Soler, J.J. (2013). Bacteriocins with a broader antimicrobial spectrum prevail in enterococcal symbionts isolated from the hoopoe's uropygial gland. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85:495-502.
- Sah, B.N.P., Vasiljevic, T., McKechnie, S. y Donkor, O.N. (2014). Effect of probiotics on antioxidant and antimutagenic activities of crude peptide extract from yoghurt. *Food Chem.* 156:264-270.
- Sánchez, B., Urdaci, M.C. y Margolles, A. (2010). Extracellular proteins secreted by probiotic bacteria as mediators of effects that promote mucosa-bacteria interactions. *Microbiol.* 156:3232-3242.
- Sánchez, J., Basanta, A., Gómez-Sala, B., Herranz, C., Cintas, L.M. y Hernández, P.E. (2007). Antimicrobial and safety aspects, and biotechnological potential of bacteriocinogenic enterococci isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Int. J. Food Microbiol.* 117:295-305.
- Sánchez, J., Borrero, J., Gómez-Sala, B., Basanta, A., Herranz, C., Cintas, L.M. y Hernández, P.E. (2008). Cloning and heterologous production of hiracin JM79, a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae*, in lactic acid bacteria and *Pichia pastoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:2471-2479.
- Sánchez, J., Diep, D.B., Herranz, C., Nes, I.F., Cintas, L.M. y Hernández, P.E. (2007). Amino acid and nucleotide sequence, adjacent genes, and heterologous expression of hiracin JM79, a Sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *FEMS Microbiol. Lett.* 270:227-236.

- Sandiford, S. y Upton, M. (2012). Identification, characterization, and recombinant expression of epidermicin NI01, a novel unmodified bacteriocin produced by *Staphylococcus epidermidis* that displays potent activity against staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:1539–1547.
- Santos J., Varella, M.L., Ceotto, H., Potter, A., Rocha, L., Salehian, Z., Nes, I.F. y Freire, M.C. (2012). Genes involved in immunity to an secretion of aureocin A53, an atypical class II bacteriocin produced by *Staphylococcus aureus* A53. *J. Bacteriol.* 194:875-883.
- Sarvas, M., Harwood, C.R., Bron, S. y van Dijl, J.M. (2004). Post-translocational folding of secretory proteins in Gram-positive bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1694:311-327.
- Sayas-Barberá, E., Viuda-Martos, M., Fernández-López, F., Pérez-Alvarez, J.A. y Sendra, E. (2012). Combined use of a probiotic culture and citrus fiber in a traditional sausage "Longaniza de Pascua". *Food Cont.* 27:343-350.
- Schillinger, U. y Lücke, F.K. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1901-1906.
- Schoeman, H., Vivier, M.A., du Toit, M., Dicks, L.M.T. y Pretorius, I.S. (1999). The development of bactericidal yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (pedA) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 15:647-656.
- Sidira, M., Galanis, A., Nikolau, A. y Kanellaki, M. (2014). Evaluation of *Lactobacillus casei* ATCC 393 protective effect against spoilage of probiotic dry-fermented sausages. *Food Cont.* 42:315-330.
- Simon, D. y Chopin, A. (1988). Construction of a vector plasmid family and its use for molecular cloning in *Streptococcus lactis*. *Biochimie.* 70:559-556.
- Sit, C.S. y Vederas, J.C. (2008). Approaches to the discovery of new antibacterial agents based on bacteriocins. *Biochem. Cell Biol.* 86:116-123.
- Sørensen, H.P. (2010). Towards universal systems for recombinant gene expression. *Microb. Cell Fact.* 9:27.
- Sørvig, E., Grönqvist, A., Naterstad, K., Mathiesen, G., Eijsink, V.G.H. y Axelsson, L. (2003). Construction of vectors for inducible gene expression in *Lactobacillus sakei* and *L. plantarum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 229:119-126.
- Sørvig, E., Mathiesen, G., Naterstad, K., Eijsink, V.G.H. y Axelsson, L. (2005). High-level, inducible gene expression in *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus plantarum* using versatile expression vectors. *Microbiol.* 151:2439-2449.
- Stepper, J., Shastri, S., Loo, T.S., Preston, J.C., Novak, P., Man, P., Moore, C.H., Havlicek, V., Patchett, M.L. y Norris, G.E. (2011). Cysteine S-glycosylation, a new post-translational modification found in glycopeptide bacteriocins. *FEBS Lett.* 585:645-650.
- Strompfová, V., Lauková, A., Simonová, M. y Marciňáková, M. (2008). Occurrence of the structural enterocin A, P, B, L50B genes in enterococci of different origin. *Vet. Microbiol.* 132:293-301.
- Svetoch, E.A. y Stern, N.J. (2010). Bacteriocins to control *Campylobacter spp.* in poultry-a review. *Poult. Sci.* 89:1763-1768.
- Svetoch, E.A., Eruslanov, B.V., Kovalev, Y.N., Mitsevich, E.V., Mitsevich, I.P., Levchuk, V.P., Fursova, N.K., Perlygin, V.V., Stepanshin, Y.G., Teymursov, M.G., Seal, B.S. y Stern, N.J. (2009). Antimicrobial activities of bacteriocins E 50-52 and B 602 against antibiotic-resistant strains involved in nosocomial infections. *Probiotics Antimicrob. Prot.* 1:136-142.
- Svetoch, E.A., Eruslanov, B.V., Perelygin, V.V., Mitsevich, E.V., Mitsevich, I.P., Borzenkov, V.N., Levchuk, V.P., Svetoch, O.E., Kovalev, Y.N., Stepanshin, Y.G., Siragusa, G.R., Seal, B.S. y Stern, N.J. (2008a). Diverse antimicrobial killing by *Enterococcus faecium* E 50-52 bacteriocin. *J. Agric. Food Chem.* 56:1942-1948.
- Svetoch, E.A., Levchuk, V.P., Pokhilenko, V.D., Eruslanov, B.V., Mitsevich, E.V., Mitsevich, I.P., Perelygin, V.V., Stepanshin, Y.G. y Stern, N.J. (2008b). Inactivating methicillin-resistant

- Staphylococcus aureus* and other pathogens by use of bacteriocins OR-7 and E 50-52. *J. Clin. Microbiol.* 46:3863-3865.
- Swe, P.M., Heng, N.C.K., Ting, Y-T., Baird, H.J., Carne, A., Tauch, A., Tagg, J.R. y Jack, R.W. (2007). ef1097 and ypkK encode enterococcin V583 and corynicin JK, members of a new family of antimicrobial proteins (bacteriocins) with modular structure from Gram-positive bacteria. *Microbiol.* 153:3218-3227.
- Theppangna, W., Murase, T., Tokumaru, N., Chikumi, H. y Otsuki, K. (2007). Screening of enterocin genes and antimicrobial activity against pathogenic bacteria in *Enterococcus* strains obtained from different origins. *J. Vet. Med. Sci.* 69:1235-1239.
- Thornton, R.F., Kagawa, T.F., O'Toole, P.W. y Cooney, J.C. (2010). The dissemination of C10 cysteine protease genes in *Bacterioides fragilis* by mobile genetic elements. *BMC. Microbiol.* 10:122.
- Tichaczek, P.S., Vogel, R.F. y Hammes, W.P. (1993). Cloning and sequencing of curA encoding curvacin A, the bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* LTH1174. *Arch. Microbiol.* 160:279-283.
- Todorov, S.D., Furtado, D.N., Saad, S.M.I. y Franco, B.D.G.d.M. (2011). Bacteriocin production and resistance to drugs are advantageous features for *Lactobacillus acidophilus* La-14, a potential probiotic strain. *New Microbiologica.* 34:357-370.
- Tominaga, T. y Hatakeyama, Y. (2007). Development of innovative pediocin PA-1 by DNA shuffling among class IIa bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:5292-5299.
- Tsapieva, A., Duplik, y Suvorov, A. (2011). Structure of plantaricin locus of *Lactobacillus plantarum* 8P-A3. *Benef. Microb.* 2:255-261.
- van Asseldonk, M., Rutten, G., Oteman, M., Siezen, R.J., de Vos, W.M. y Simons, G. (1990). Cloning of usp45, a gene encoding a secreted protein from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MG1363. *Gene.* 95:155-160.
- van de Guchte, M., van der Vossen, J.M.B.M., Kok, J. y Vemena, G. (1989). Construction of a lactococcal expression vector: expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:224-228.
- van Hemert, S., Meijerink, M., Molenaar, D., Bron, P.A., de Vos, P., Kleerebezem, M., Wells, J.M. y Marco, M.L. (2010). Identification of *Lactobacillus plantarum* genes modulating the cytokine response of human peripheral blood mononuclear cells. *BMC Microbiol.* 10:293.
- van Ooyen, A.J.J., Dekker, P., Huang, M., Olsthoorn, M.M.A., Jacobs, D.I., Colussi, P.A. y Taron, C.H. (2006). Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces fragilis*. *FEMS Yeast Res.* 6:381-392.
- van Reenen, C.A., Chikindas, M.L., van Zyl, W.H. y Dicks L.M.T. (2002). Characterization and heterologous expression of a class IIa bacteriocin, plantaricin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food. Microbiol.* 81:29-40.
- Van Wely, K.H.M., Swaving, J., Freudl, R. y Driessen, A.J.M. (2001). Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25:437-454.
- Venema, K., Kok, J., Marugg, J.D., Toonen, M.Y., Ledebor, A.M., Venema, G. y Chikindas, M.L. (1995). Functional analysis of the pediocin operon of *Pediococcus acidilactici* PAC1.0: Pedb is the immunity protein and PedD is the precursor processing enzyme. *Mol. Microbiol.* 17:515-522.
- Wan, X., Li, R., Saris, P.E. y Takala, T.M. (2013). Genetic characterisation and heterologous expression of leucocin C, a class IIa bacteriocin from *Leuconostoc carnosum* 4010. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97(8):3509-18.
- Wang, Q., Fu, W., Ma, Q., Yu, Z. y Zhang, R. (2013). Production of bacteriocin E50-52 by small ubiquitin-related modifier fusion in *Escherichia coli*. *Pol. J. Microbiol.* 62(4):345-50.

- Wienacker, D., Rabert, C., Zepeda, A.B., Figueroa, C.A., Pessoa, A. y Farías, J.G. (2013). Applications of recombinant *Pichia pastoris* in the healthcare industry. *Brazilian J. of Microbiol.* 44(4):1043-1048.
- Ward, N.J., Buckley, S.M., Waddington, S.N., Van den Driesche, T., Chuah, M.K., Nathwani, A.C., McIntosh, J., Tuddenham, E.G., Kinnon, C., Thraser, J. y McVey, J.H. (2011). Codon optimization of human factor VIII cDNAs leads to high level expression. *Blood*. 117:798-80.
- Willems, R.J.L., Hanage, W.P., Bessen, D.E. y Feil, E.J. (2011). Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 35:872-900.
- Wu, Z., Wang, W., Tang, M., Shao, J., Dai, C., Zhang, W., Fan, H., Yao, H., Zong, J., Chen, D., Wang, J. y Lu, C. (2014). Comparative genomic analysis shows that *Streptococcus suis* meningitis isolate SC070731 contains a unique 105K genomic island. *Gene* 535:156-164.
- Xu, Y. y Li, Y. (2007). Induction of immune responses in mice after intragastric administration of *Lactobacillus casei* producing porcine parvovirus VP2 protein. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(21):7041-7047.
- Zerbs, S., Frank, A.M. y Collart, F.R. (2009). Bacterial systems for production of heterologous proteins. *Methods Enzymol.* 463:149-168.
- Zhao, Y. y Jensen, O.N. (2009). Modification-specific proteomics: strategies for characterization of post-translational modifications using enrichment techniques. *Proteomics*. 9:4632-4641.
- Zhou, X.X., Li, W.F., Ma, G.X. y Pan, Y.J. (2006). The nisin-controlled gene expression system: Construction, application and improvements. *Biotechnol. Adv.* 24:285-295.

## **Apéndices**





## APÉNDICE 1: LISTADO DE ABREVIATURAS

### Abreviaturas generales.

**$\alpha$ MF**: del inglés  *$\alpha$  Mating Factor*  
 **$\Delta\Psi$** : Potencial de Membrana  
 **$\Delta$ pH**: gradiente de pH  
**A**: Adenina  
**A<sub>254</sub>**: Absorbancia a 254 nm  
**ABC**: del inglés *ATP Binding Cassette*  
**ABTS**: 2,2'-azino-bis[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid  
**AcdA**: Acidocina A  
**AcdB**: Acidocina B  
**ADN**: Ácido Desoxirribonucleico  
**ADP**: del inglés *Adenosin Diphosphate*  
**ADT**: del inglés *Agar Diffusion Test*  
**AG**: Aparato de Golgi  
**ARN**: Ácido Ribonucleico  
**ARNm**: ARN mensajero  
**ARNr**: ARN ribosómico  
**ATP**: del inglés *Adenosine Triphosphate*  
**BAL**: Bacterias Ácido-Lácticas  
**BacE50-52**: Bacteriocina E 50-52  
**bp**: del inglés *base pair*  
**BHI**: del inglés *Brain Heart Infusion* (medio de cultivo)  
**BMM**: Medio de cultivo mínimo para *Pichia pastoris*  
**BMMY**: Medio de cultivo complejo para *Pichia pastoris*  
**BU**: del inglés *Bacteriocin Unit*  
**C**: Citosina  
**CbnA**: Carnobacteriocina A  
**CbnB2**: Carnobacteriocina B2  
**CbnBM1**: Carnobacteriocina BM1  
**CbnBM2**: Carnobacteriocina BM2  
**CclA**: Carnociclina A  
**CD**: del inglés *Circular Dichroism*  
**CDW**: del inglés *Cell Dry Weight*  
**Cm**: del inglés *Chloramphenicol*  
**ColV**: Colicina V  
**CurA**: Curvacina A  
**Da**: Dalton  
**DF**: del inglés *Dimeric Form*  
**Dha**: Deshidroalanina  
**Dhb**: Deshidrobutirina  
**DSB**: del inglés *Disulfide Bond*  
**DTS**: del inglés *Dedicated Transport System*  
**DvnA**: divergicina A  
**DvnV41**: divergicina V41

**DvnM35:** divergicina M35  
**ED:** Enlace Disulfuro  
**EDTA:** Etilén Diamino Tetracetato Disódico  
**ELISA-NCI:** Ensayo Inmunoenzimático No Competitivo Indirecto  
**Em:** del inglés *Erythromycin*  
**EntA:** enterocina A  
**EntA/SakA:** Quimera de la enterocina A y la sakacina A  
**EntB:** enterocina B  
**EntEJ97:** enterocina EJ97  
**EntJS:** enterocina JS  
**EntL50:** enterocina L50  
**EntP:** enterocina P  
**EntP/SakA:** Quimera de la enterocina P y la sakacina A  
**EntQ:** enterocina Q  
**EntSE-K4:** enterocina SE-K4  
**EntV583:** enterocina V583  
**EP:** Espacio Periplásmico  
**EPM:** Ensayo en Placas Microtituladoras  
**ER:** del inglés *Endoplasmic Reticulum*  
**FPLC:** del inglés *Fast Performance Liquid Chromatography*  
**FtsY:** receptor del SRP  
**G:** Guanina  
**GG:** Doble glicina  
**GarML:** garvicina ML  
**GelE:** del inglés *Gelatinase*  
**GI:** Gastrointestinal  
**GM17:** Medio M17 con glucosa  
**GRAS:** del inglés *Generally Recognized as Safe*  
**GSP:** del inglés *General Secretory Pathway*  
**GTP:** del inglés *Guanine Triphosphate*  
**HirJM79:** hiracina JM79  
**HPK:** del inglés *Histidine Protein Kinase*  
**HPLC:** del inglés *High Pressure Liquid Chromatography*  
**IP:** del inglés *Induction Peptide*  
**IF:** del inglés *Induction Factor*  
**IgG:** inmunoglobulina G  
**kb:** Kilobases  
**kDa:** Kilodalton  
**KLH:** del inglés *Keyhole Limpet Hemocyanin*  
**LAB:** del inglés *Lactic Acid Bacteria*  
**LacF:** Lactacina F  
**Lan:** Lantionina  
**LAL:** Lisinoalanina  
**LB:** Luria-Bertany (medio de cultivo)  
**LcnA:** Lactococina A  
**Lcn972:** Lactococina 972  
**LS:** del inglés *Leader Sequence*

**MALDI-TOF:** del inglés *Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight*  
**Man-PTS:** del inglés *Mannose-Phosphotransferase System*  
**MCS:** del inglés *Multiple Cloning Site*  
**MDR:** del inglés *Multidrug Resistance*  
**ME:** Membrana Externa  
**MeLan:** Metil-lantionina  
**MesY105:** Mesentericina Y105  
**MF $\alpha$ 1s:** del inglés *Mating Pheromone  $\alpha$ -factor 1 secretion signal*  
**Mg<sup>2+</sup>:** Magnesio  
**MPA:** del inglés *Microtitre Plate Assay*  
**MRS:** de Man, Rogosa y Sharpe (medio de cultivo)  
**MS:** del inglés *Mass Spectrometry*  
**NBD:** del inglés *Nucleotide-binding Domain*  
**NBS:** del inglés *Nucleotide-Binding Sites*  
**NCI-ELISA:** del inglés *Non-Competitive Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*  
**NICE:** del inglés *Nisin Controlled Expression System*  
**NMR:** del inglés *Nuclear Magnetic Resonance*  
**NisA:** nisina A  
**OD<sub>600</sub>:** del inglés *Optical Density* a 600 nm  
**ORF:** del inglés *Open Reading Frame*  
**P61:** Piscicolina P61  
**PA:** Proteína Accesorio  
**Pb:** Pares de bases  
**PCR:** del inglés *Polymerase Chain Reaction*  
**PedA-1:** pediocina PA-1  
**pI:** Punto isoelectrico  
**Pln423:** Plantaricina 423  
**PMF:** del inglés *Proton Motive Force*  
**PS:** Péptido señal  
**p/v:** peso / volumen  
**QPS:** del inglés *Qualified Presumption of Safety*  
**RBS:** del inglés *Ribosome Binding Site*  
**RP:** del inglés *Reverse Phase*  
**RR:** del inglés *Response Regulator*  
**SakA:** sakacina A  
**SakP:** sakacina P  
**SDS-PAGE:** del inglés *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*  
**SL:** Secuencia líder  
**SP:** del inglés *Signal Peptide*  
**SRP:** del inglés *Signal Recognition Particle*  
**T:** Timina  
**TFA:** del inglés *Trifluoroacetic Acid*  
**TMD:** del inglés *Transmembrane Domain*  
**TMS:** del inglés *Transmembrane Segment*  
**TSB:** Tryptone Soya Broth (medio de cultivo)  
**Usp45:** del inglés *Unknown Secreted Protein of 45 kDa*  
**Wt/vol:** del inglés *weight/volume*

**YCB:** del inglés *Yeast Carbon Base*

**YMM:** del inglés *Yeast Minimal Medium*

**YNB:** del inglés *Yeast Nitrogen Base*

**YPD:** del inglés *Yeast extract Peptone Dextrose*

**Zeo:** del inglés *Zeocin*

### Abreviaturas de nucleótidos.

<b>A (AMP)</b>	Adenina monofosfato o ácido adenílico
<b>C (CMP)</b>	Citosina monofosfato o ácido citidílico
<b>G (GMP)</b>	Guanosina monofosfato o ácido guanidílico
<b>T (TMP)</b>	Timidina monofosfato o ácido timidílico
<b>U (UMP)</b>	Uridina monofosfato o ácido uridílico

### Abreviaturas y masa molecular de los aminoácidos.

Aminoácidos	Abreviaturas		Masa molecular (Da)
No modificados postraduccionalmente			
Ácido aspártico	Asp	D	133
Ácido glutámico	Glu	E	147
Alanina	Ala	A	89
Arginina	Arg	R	174
Asparagina	Asn	N	132
Cisteína	Cys	C	121
Fenilalanina	Phe	F	165
Glicina	Gly	G	75
Glutamina	Gln	Q	146
Histidina	His	H	155
Isoleucina	Ile	I	131
Leucina	Leu	L	131
Lisina	Lys	K	146
Metionina	Met	M	149
Prolina	Pro	P	115
Serina	Ser	S	105
Tirosina	Tyr	Y	181
Treonina	Thr	T	119
Triptófano	Trp	W	204
Valina	Val	V	117
Modificados postraduccionalmente			
Dehidroalanina	Dha	-	-
Dehidrobutirina	Dhb	-	-
Lantionina	Lan	-	-
β-metil-lantionina	MeLan	-	-

## APÉNDICE 2: LISTADO DE TABLAS

<b>Capítulo 2</b>		<b>Pág.</b>
<b>Tabla 2.1</b>	Esquema de la clasificación más aceptada propuesta para las bacteriocinas	16
<b>Tabla 2.2</b>	Secuencia aminoacídica de algunas bacteriocinas sintetizadas sin péptido señal o secuencia líder	30
<b>Tabla 2.3</b>	Factores que pueden modificar la producción y actividad antimicrobiana de bacteriocinas producidas por diversos hospedadores.	38
<b>Capítulo 3 / Chapter 3</b>		
<b>Table 3.1</b>	Microbial strains and plasmids used in this study	49
<b>Table 3.2</b>	Primers, PCR products, and bacteriocins used in this study	53
<b>Table 3.3</b>	Bacteriocin production and antimicrobial activity of supernatants from recombinant LAB strains producing SakA and the EntP/SakA and EntA/SakA chimeras	58
<b>Table 3.4</b>	Antimicrobial activity of supernatants from recombinant LAB strains against <i>Listeria</i> spp.	60
<b>Table 3.5</b>	Production and antimicrobial activity of SakA and EntP/SakA from supernatants of <i>P. pastoris</i> X-33SA, <i>P. pastoris</i> X-33PSA, <i>K. lactis</i> GG799SA, and <i>K. lactis</i> GG799PSA	67
<b>Capítulo 4 / Chapter 4</b>		
<b>Table 4.1</b>	Bacterial strains and plasmids used in this study	82
<b>Table 4.2</b>	Primers and PCR products used in this study	83
<b>Table 4.3</b>	Production and antimicrobial activity of the EntA from supernatants of <i>P. pastoris</i> X-33EAS and <i>K. lactis</i> GG799EAS	87
<b>Table 4.4</b>	Antimicrobial activity of fractions generated during purification of the BacE50-52 produced by the recombinant <i>P. pastoris</i> X-33 and <i>K. lactis</i> GG799 derivatives	91
<b>Table 4.5</b>	Antimicrobial activity <sup>a</sup> of the purified EntA and BacE50-52 produced by the recombinant <i>P. pastoris</i> X-33 and <i>K. lactis</i> GG799 derivatives against <i>Listeria</i> spp.	94
<b>Capítulo 5 / Chapter 5</b>		
<b>Table 5.1</b>	Bacterial strains and plasmids used in this study	106
<b>Table 5.2</b>	Primers and PCR products used in this study	109
<b>Table 5.3</b>	Bacteriocin production and antimicrobial activity of supernatants from recombinant strains	110
<b>Table 5.4</b>	Antimicrobial activity of supernatants from recombinant <i>Lactobacillus</i> spp. strains against <i>Listeria</i> spp.	112

**Capítulo 6 / Chapter 6**

---

<b>Table 6.1</b>	Oligonucleotides used in PCR-amplification reactions and DNA sequencing	129
<b>Table 6.2</b>	Deduced ORFs in the 11,456-bp <i>entJSA-entJSB</i> containing fragment from <i>E. faecalis</i> DBH18 and closest relatives of the deduced proteins	135
<b>Table 6.3</b>	Antimicrobial activity and synergistic antimicrobial activity of the <i>in vitro</i> -synthesized EntL50A, EntL50B, EntJSA, and EntJSB	139
<b>Table 6.4</b>	Production of EntL50A and EntL50B in supernatants from <i>E. faecium</i> L50 and <i>E. faecalis</i> DBH18	140
<b>Table 6.5</b>	Antimicrobial activity and inhibitory spectrum of supernatants from <i>E. faecalis</i> DBH18 and <i>E. faecium</i> L50	143

---

---

## APÉNDICE 3: LISTADO DE FIGURAS

Capítulo 2		Pág.
<b>Figura 2.1</b>	Esquema simplificado de la fermentación láctica.	9
<b>Figura 2.2</b>	Árbol filogenético basado en estudios comparativos de la fracción 16S del ARNr de diversas especies de Enterococos. La longitud de la barra indica un 5% de divergencia estimada en la secuencia. Fuente: Franz y col. (2003)	11
<b>Figura 2.3</b>	Posibles aplicaciones de las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas. Fuente: De Vuyst y Leroy (2007)	13
<b>Figura 2.4</b>	Homología entre las bacteriocinas de la clase IIa. La mitad N-terminal es menos variable que la C-terminal y la clasificación de las bacteriocinas en 4 subgrupos se basa en semejanzas y diferencias en su región C-terminal. Se reconoce una estructura a modo de bisagra flexible en la posición D17 conservada (en verde) de las bacteriocinas del subgrupo 1 y, presumiblemente, también en la posición D17/N17 (en verde) de bacteriocinas de los subgrupos 2, 3 y 4. Esta bisagra flexible separaría la lámina- $\beta$ del dominio N-terminal del dominio C-terminal. El color asignado a los aminoácidos es el siguiente: D, N, Q y E en verde; I, L y V en morado; Y, W y F en negro; C en gris; A y G en amarillo; H, K y R en azul; S y T en rojo; P en blanco; M en azul oscuro. Cabe destacar que para numerar los aminoácidos (en la zona superior de la figura) se toma como número 1 al segundo aminoácido, situado justo antes de la secuencia consenso YGNGV ya que éste es el primero de la bacteriocina madura de la mayoría de ellas. Fuente: Nissen-Meyer y col. (2009)	17
<b>Figura 2.5</b>	Modo de acción tradicional propuesto para bacteriocinas producidas por bacterias lácticas. Su modo de acción deriva de su: unión a la membrana mediante interacciones electrostáticas ( <b>A</b> ), inserción en la misma ( <b>B</b> ) y la formación de poros que pueden ser de dos tipos: en forma de duela de barril ( <b>C</b> ) o de cuña ( <b>D</b> ). Fuente: Martínez (2000).	21
<b>Figura 2.6</b>	Inmunidad debida a la lactococina A, lactococina B y, posiblemente, a otras bacteriocinas de la clase IIa. ( <b>A</b> ) La bacteriocina reconoce las subunidades IIC y IID del sistema manosa-fosfotransferasa (man-PTS) como receptores en las células diana (1 y 2). Tras unirse a ellas, la bacteriocina activa la permeabilización de la membrana (3) permitiendo la liberación de componentes celulares y desencadenando la muerte celular. ( <b>B</b> ) En las células inmunes o resistentes (1'), la proteína de inmunidad (I) no se encuentra unida a proteínas del sistema man-PTS. Sólo cuando la bacteriocina se añade al medio de cultivo (2'), la proteína de inmunidad (I) se aproxima y se une a la proteína receptora (subunidades IIC y IID). De esta manera, las bacterias inmunes o resistentes a la actividad de las bacteriocinas quedan protegidas, probablemente por el bloqueo de la unión de la bacteriocina al receptor, evitando de este modo su muerte celular (3'). En las bacterias productoras de bacteriocina (3'), la	23



	proteína de inmunidad (I) se encuentra fuertemente asociada con el receptor de la bacteriocina para proteger al microorganismo productor de su actividad antimicrobiana. Fuente: Diep y col (2007).	
<b>Figura 2.7.</b>	(A) Organización de los genes implicados en la biosíntesis de la enterocina A. La letra P representa los promotores que transcriben los diferentes genes. (B) Representación esquemática del procesamiento, transporte, secreción y regulación de la enterocina A. Los detalles se describen en el texto. Fuente: Martín (2006)	25
<b>Figura 2.8</b>	Imagen de la sakacina A obtenida mediante NMR. Fuente: Bactibase	26
<b>Figura 2.9</b>	Transporte y secreción de proteínas mediante la ruta general de secreción (GSP) y una translocasa Sec-dependiente. La translocasa Sec-dependiente bacteriana comprende un complejo proteico de la membrana citoplasmática formado por un dominio móvil periférico SecA (verde), la proteína formadora del canal conductor SecYEG (naranja) y las proteínas accesorias SecDF (naranja oscuro) e YidC (rojo). La peptidasa señal (SPase)(rojo) es una peptidasa asociada a la membrana citoplásmica que libera el SP de la preproteína en la cara exterior de la membrana. (a) Modelo post-traduccion. Las proteínas para secretar al medio extracelular (negro) se unen, postraduccionalmente, a la chaperona SecB (azul) que facilita su unión a la translocasa por la afinidad de SecB con la proteína SecA. (b) Modelo co-traduccion. Las proteínas de membrana y algunas preproteínas se unen co-traduccionalmente a la translocasa por medio de la unión del ribosoma (amarillo) a la partícula reconocedora del péptido señal (SRP) que, a su vez, se une a la proteína receptora FtsY (morado). (c) Algunas proteínas de membrana se insertan en la membrana citoplasmática directamente a través de YidC. PMF es la Fuerza Protón Motriz (del inglés, <i>Proton Motive Force</i> ). Fuente: Driessen y Nouwen, (2008).	35
<b>Figura 2.10</b>	Vector de expresión proteica pPICZαA	41

### Capítulo 3 / Chapter 3

<b>Figure 3.1</b>	Mass spectrometry analysis of purified sakacin A from <i>Lb. sakei</i> Lb706 (A), purified sakacin A from <i>L. lactis</i> NZ9000 (pNUS) (B), purified enterocin P/sakacin A from <i>L. lactis</i> NZ9000 (pNUPS) (C), and purified enterocin A/sakacin A from <i>L. lactis</i> NZ9000 (pNUAS) (D). Bold numbers indicate the molecular mass in daltons of most of the observed peptide fragments.	65
<b>Figure 3.2</b>	Mass spectrometry analysis of purified enterocin P/sakacin A from <i>P. pastoris</i> X-33PSA (A), purified sakacin A from <i>K. lactis</i> GG799SA (B), and purified enterocin P/sakacin A from <i>K. lactis</i> GG799PSA (C). Bold numbers indicate the molecular mass in daltons of most of the observed peptide fragments.	69

---

**Capítulo 4 / Chapter 4**


---

- Figure 4.1** Mass spectrometry analysis of purified enterocin A from *P. pastoris* X-33EAS (A), and *K. lactis* GG799EAS (B). Numbers indicate the molecular mass in daltons of most of the observed peptide fragments. 88
- Figure 4.2** Mass spectrometry analysis of purified bacteriocin E 50-52 from *P. pastoris* X-33E50-52S (A), and *K. lactis* GG799E50-52S (B). Numbers indicate the molecular mass in daltons of most of the observed peptide fragments. 89

---

**Capítulo 5 / Chapter 5**


---

- Figure 5.1** Mass spectrometry analysis of purified enterocin A from *Lb. sakei* Lb790 (pSIP411UAI) (A), and from *Lb. casei* CECT475 (pSIP411UAI) (B). 114

---

**Capítulo 6 / Chapter 6**


---

- Figure 6.1** PCR-amplification fragments of purified genomic DNA from *E. faecium* L50 (A) and *E. faecalis* DBH18 (B), using primers EntL50-R1 and EntL50-R2 and an annealing temperature gradient of 50.8° C (lane 1), 52.5° C (lane 2), 55.2° C (lane 3), 57.1° C (lane 4), 59.0° C (lane 5), 61.0° C (lane 6), 63.5° C (lane 7), and 64.9° C (lane 8). M, nucleic acid molecular size marker 100 bp DNA ladder. 133
- Figure 6.2** Nested PCR-amplification of purified genomic DNA from *E. faecium* L50 and *E. faecalis* DBH18 for amplification of *entL50A* and *entL50B* and adjacent genes deduced from *E. faecium* L50. Results for *E. faecium* L50 (A). Lane 1, GL50B-F/EntL50-R2 (1,680-bp); lane 2, EL50B-F/EntL50-R2 (1,053-bp); lane 3, L50J45-F/L50J45-R (450-bp); lane 4, L50J40-F/L50J40-R (400-bp); lane 5, EntL50-R1/EntL50-R2 (286-bp and 132-bp); lane 6, EntL50-R1/L50AD-R (1,502-bp), and lane 7 EntL50-R1/L50AC-R (1,832-bp). Results for *E. faecalis* DBH18 (B). Lanes 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7, as cited above. M, nucleic acid molecular size marker 100-bp DNA ladder. 133
- Figure 6.3** Antimicrobial activity of the *in vitro*-synthesized EntL50A, EntL50B, EntJSA and EntJSB by the spot-on-agar test using *P. damnosus* CECT4797 (A), *P. acidilactici* 347 (B), and *Lb. buchneri* CECT4674 (C) as the indicator microorganisms. Mixtures of the *in vitro*-synthesized bacteriocins in a 1:1 ratio: EntL50A (1), EntL50B (2), EntJSA (3), EntJSB (4), EntL50A + EntL50B (5), EntL50A + EntJSA (6), EntL50A + EntJSB (7), EntL50B + EntJSA (8), EntL50B + EntJSB (9), EntJSA + EntJSB (10), EntL50A + EntL50B + EntJSA (11), EntL50A + EntL50B + EntJSB (12), EntL50A + EntJSA + EntJSB (13), EntL50B + EntJSA + EntJSB (14), and EntL50A + EntL50B + EntJSA + EntJSB (15). 138
- Figure 6.4** Similarity between the described *entL50A-entL50B*-like sequences (A). Deduced amino acid sequence of the EntL50A-EntL50B-like 141

leaderless bacteriocins (B). EntJSA is identical to EntMR10A, EntNA, BacESL-5 and Ent7A with replacement of residue D by E at position 38 of their amino acid sequences. EntJSB is identical to EntMR10B, EntNB, BacESL-5 and Ent7B with replacement of residues A by T and L by F at positions 9 and 15, respectively, of their amino acid sequences.

- Figure 6.5** Genetic organization of gene clusters encoding *entL50A-entL50B* and *entL50A-entL50B*-like genes in *E. faecium* L50, *E. faecium* 6T1a and *E. faecalis* DBH18. Genes are indicated as follows: intense green, insertion sequences; red, genes encoding bacteriocins EntL50 (*entL50A* and *entL50B*), enterocin I (*entI* and *entJ*) and enterocin JSA (*entJSA* and *entJSB*), respectively; yellow-brown, hypothetical proteins; light green, hypothetical proteins from *E. faecalis*; blue, genes possibly encoding a putative ABC transporter complex. Numbers refer to number of amino acids in encoded proteins. 145
- Figure 6.6** Zoomed view by MALDI-TOF MS analysis of the purified bacteriocins produced by *E. faecalis* DBH18. 147
-

\*Los codones de terminación de la traducción se indican con un asterisco

